

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA VACCINATION BCG PAR VOIE BUCCALE CHEZ LES ADOLESCENTS ET LES ADULTES NON ALLERGIQUES

*Intérêt que présente cette méthode pour la prémunition
du personnel sanitaire, des établissements hospitaliers
et des étudiants en médecine,*

par A. CALMETTE.

Après les premiers essais réalisés par B. Weill-Hallé à la crèche de l'hôpital de la Charité, en 1921, en vue de prémunir les nourrissons contre l'infection tuberculeuse, nous avons cru pouvoir répondre au désir des médecins qui souhaitaient utiliser le BCG dans les familles. Mais nous n'envisagions et ne recommandions l'emploi de cette méthode que pour la vaccination des *nouveau-nés*, telle que nous l'avions mise en pratique avec C. Guérin pour les jeunes veaux. Cette limitation nous était imposée par les deux considérations suivantes :

1° L'infection bacillaire est particulièrement grave chez le très jeune enfant, puisque presque tous ceux qui sont contaminés pendant les trois premiers mois de leur vie succombent au cours de la première ou, au plus, de la deuxième année. Il

est donc nécessaire de faire en sorte que la prémunition soit réalisée dans le délai le plus court possible après la naissance.

2° Il est établi par de nombreux travaux (C. Weigert, Disse, Behring et Römer, Ehrlich, Vaillard, G. Ramon et Grasset, A. Boquet, P. Nélis et van Bœckel, A. Saenz, etc.) que l'intestin des jeunes animaux à la mamelle, et celui des jeunes enfants dans les deux premières semaines qui suivent la naissance, est très perméable aux éléments microbiens. A cette époque de la vie, la muqueuse intestinale n'est pas encore différenciée et les microbes qui la franchissent entrent aisément dans la circulation lymphatique. On doit donc profiter de ces conditions particulièrement favorables à l'administration du vaccin *par la voie même par laquelle se réalise le plus souvent l'infection naturelle*. Outre l'avantage d'être facilement acceptée par les familles, l'ingestion ne risque pas de provoquer le moindre abcès, contrairement à ce qui arrive parfois après l'injection sous-cutanée; elle n'est suivie d'aucune réaction thermique ou autre et elle est parfaitement inoffensive.

C'est pourquoi cette méthode est entrée si rapidement dans la pratique, non seulement en France, mais dans beaucoup d'autres pays. Des centaines de milliers d'enfants l'ont éprouvée sans le moindre incident qui ait pu lui être légitimement attribué; elle contribue, partout où on l'emploie, à supprimer presque totalement la mortalité tuberculeuse et à réduire dans d'importantes proportions la mortalité générale infantile.

Mais, après avoir ainsi établi la technique qui devait permettre de prémunir les nouveau-nés aussitôt après leur entrée dans un monde où ils risquent d'être rapidement victimes d'une infection bacillaire précoce, nous avons le devoir de chercher à étendre les bénéfices de cette prémunition aux sujets de divers âges qui, ayant échappé aux occasions si fréquentes de contamination au cours de leurs premiers mois ou de leurs premières années de vie, risquaient de se trouver en présence d'une source de contagion insoupçonnée. Nous ne pouvions toutefois considérer comme *vaccinables* que les sujets apparemment indemnes de toute lésion tuberculeuse même occulte, et *non allergiques*, c'est-à-dire ne réagissant pas à la tuberculine. Les autres, déjà allergiques, — les plus

nombreux d'ailleurs puisque, dans les pays de vieille civilisation comme la France, 97 p. 100 au moins des adultes réagissent à la tuberculine, — ne sont pas aptes à être vaccinés parce que déjà parasités par quelques bacilles virulents. En s'adressant surtout aux enfants de deux à cinq ans et à ceux d'âge scolaire, dont il semble que 65 à 70 p. 100 ne sont pas encore allergiques, la prémunition apparaissait pratiquement réalisable aux conditions suivantes : 1° qu'on soit sûr que les bacilles-vaccins vivants sont réellement absorbés; 2° qu'ils se montrent capables de se multiplier dans les organes lymphatiques; 3° qu'ils déterminent cette maladie légère, traduite par une micropolyadénie généralisée qu'on peut appeler la *Bécégéte*, dont l'évolution, à peine perceptible, dure quatre à cinq semaines et qui se termine par l'établissement de la *résistance aux surinfections*, c'est-à-dire de l'immunité antituberculeuse.

*
* *

Il nous a paru tout d'abord que, pour assurer dans le plus bref délai cette prémunition chez les sujets qui n'ont pas pu être vaccinés dans les premiers jours après leur naissance, le procédé le plus sûr devait être, comme pour la plupart des autres vaccinations microbiennes, l'inoculation du BCG par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intradermique. La voie sous-cutanée eut tout de suite de nombreux partisans; d'abord B. Weill-Hallé, puis Parisot et Saleur, L. Guinard, en France, J. Heimbeck, O. Scheel, en Norvège, et, à leur suite, beaucoup d'autres dans les divers pays. Elle développe, en général, l'allergie tuberculinique dans un délai d'environ trois mois. Mais elle offre l'inconvénient de provoquer parfois, quoique très rarement depuis qu'on sait mieux préparer des émulsions vaccinales homogènes, un petit abcès froid qui ne se résorbe que lentement ou qu'il faut ponctionner pour en évacuer le contenu. Cet abcès est inoffensif; il est même, sans aucun doute, très efficacement protecteur pour l'organisme menacé de tuberculose; mais il est désagréable, gênant. Il vaut mieux s'efforcer de l'éviter. C'est pourquoi on s'est adressé à la voie intramusculaire (M^{me} Delanoë), et, de préférence, à la voie intradermique. C'est cette dernière qu'utilisent depuis

plusieurs années Wallgren en Suède, William H. Park, Kereszturi et B. Schick à New-York. Ils la trouvent plus commode, également inoffensive; ils constatent qu'elle confère plus rapidement et plus sûrement l'allergie qui témoigne de l'existence d'une immunité.

Le principal avantage de la vaccination par inoculation parentérale est qu'elle ne nécessite qu'une seule injection d'une très faible dose de BCG, 1/100 ou 1/50 de milligramme, suivant l'âge. La quantité de bacilles introduite dans l'organisme par cette inoculation importe peu : elle doit seulement être suffisante pour assurer l'ensemencement du bacille-vaccin dans la lymphe et l'extension de sa culture aux divers organes lymphatiques. Si l'infection restait locale et si les bacilles étaient détruits ou immobilisés sur place, il est évident qu'il ne pourrait en résulter qu'une résistance fugace aux surinfections, telle que celle que détermine l'inoculation sous-cutanée ou intradermique de bacilles morts.

Mais, quoi que l'on fasse, la vaccination par injection est difficilement acceptée par les familles, surtout pour les enfants qui fréquentent les écoles. Elle nécessite une piqûre qui, si peu douloureuse qu'elle soit, est redoutée par les personnes pusillanimes. Il y a donc grand intérêt à tâcher de lui substituer la même technique qui est si bien accueillie pour les nouveaux-nés. Cette substitution ne peut toutefois être envisagée que s'il est démontré qu'administré par voie buccale aux sujets de tous âges, l'efficacité préventive du BCG demeure sensiblement égale à celle de l'injection sous-cutanée ou intradermique.

Nous avons entrepris en premier lieu dans ce but, avec nos collaborateurs, en particulier C. Guérin, A. Boquet, L. Nègre, J. Valtis, A. Saenz, J. Troisier, et aussi avec Wilbert et Delorme, en Guinée, de nombreuses expériences afin d'étudier la possibilité de vacciner les animaux de toutes espèces, adultes, avec le BCG *par voie buccale*.

PRÉMUNITION DES SUJETS DE TOUS AGES, NON ALLERGIQUES,
PAR LA VOIE BUCCALE.

Ces expériences ont établi que, contrairement à ce que nous avions d'abord pensé, l'intestin de tous les animaux, même

celui des ruminants et malgré la complexité de leur estomac, est parfaitement perméable aux bacilles tuberculeux vivants, virulents ou atténués. L'infection virulente s'effectue avec une grande facilité par le tube digestif lorsque la quantité des éléments microbiens ingérée est convenablement dosée selon les différentes espèces animales. Le cobaye est constamment infecté lorsqu'on lui fait ingérer 1/10 de milligramme de tuberculose bovine (souche Vallée); le lapin 2 à 3 milligrammes. Les singes callitriches, patas et chimpanzés, d'après les recherches de Wilbert, à Kindia, sont infectés par de minimes quantités de bacilles virulents absorbés *per os* : deux ingestions de 1/1.000 de milligramme de souche bovine ou humaine leur donnent une tuberculose généralisée mortelle en trois à six mois.

La raison pour laquelle plusieurs expérimentateurs ont prétendu, avec Flügge, qu'il fallait beaucoup de microbes virulents pour infecter par le tube digestif les animaux sensibles, alors qu'un seul bacille suffirait à réaliser cette infection par les voies respiratoires, est que, presque jamais on n'a eu la patience d'attendre et de conserver les animaux d'expériences assez longtemps pour permettre à l'infection tuberculeuse d'origine digestive d'évoluer. Cette évolution, avec des doses minimales de bacilles, est, en effet, très lente. Chez le cobaye, elle peut durer plus d'une année. Elle est vraisemblablement encore bien plus lente chez les bovins et chez les sujets de l'espèce humaine.

Heureusement, déjà quelques semaines ou quelques mois après l'absorption virulente *per os*, les cobayes commencent à réagir à la tuberculine et, par des intradermo-tuberculinations convenablement effectuées et répétées, on peut noter l'époque à laquelle l'animal infecté devient allergique. Après l'infection par de très faibles doses de bacilles, ainsi que cela a été particulièrement démontré par les travaux de nos collaborateurs A. Boquet et A. Saenz, ce délai peut être très long et s'étendre jusqu'à six et même huit mois.

Ces faits sont importants à connaître car nous les voyons se reproduire dans des conditions identiques après absorption du BCG par voie buccale.

Mais c'est surtout l'expérimentation chez les sujets humains

de divers âges qui permet de se rendre compte de la réalité de cette absorption et de l'état de prémunition qui en est la conséquence, par la recherche de l'époque à laquelle l'allergie tuberculinique commence à se manifester.

*
* *

Comme il était presque impossible de faire une expérience qui fût vraiment démonstrative à cet égard en Europe, où, — nous le savons, — l'infection bacillaire est presque générale et où, à l'âge adulte, la presque totalité des sujets réagissent à la tuberculine, nous nous sommes adressés aux populations de l'Afrique équatoriale chez lesquelles on trouve heureusement encore une grande majorité de non allergiques.

Notre filiale de l'Institut Pasteur de Brazzaville a bien voulu se charger d'exécuter notre programme de recherches et nous devons en remercier nos collègues Vaucel et Boisseau qui, l'un après l'autre, ont fait eux-mêmes les tuberculinations préalables et les vaccinations par voie buccale des non allergiques.

En 1931, on a d'abord procédé à l'épreuve tuberculinique de Pirquet sur 525 sujets d'âges différents, tous indigènes, appartenant aux deux missions des Pères du Saint-Esprit et des religieuses, ainsi qu'aux deux écoles des villages de Poto-Poto et de Bacongô. Cette épreuve a fait découvrir 116 allergiques, ce qui donne un indice d'infection bacillaire de 22 p. 100.

Voici la répartition des résultats suivant les âges :

	NOMBRE de sujets	POURCENTAGE des réactions +
Cinq à dix ans.	178	45,0
Dix à quinze ans.	236	24,1
Au-dessus de quinze ans.	111	30,0
	525	22,0

De ces 525 sujets d'âges différents, 369 non allergiques furent alors vaccinés *par voie sous-cutanée*, dont 273 avec 1/100 de milligramme de BCG et 96 avec 1/50 de milligramme.

A la suite de ces vaccinations, la proportion des sujets devenus allergiques était, entre le troisième et le cinquième mois, de 45 p. 100.

C'est après que ces premiers résultats nous furent connus que nous avons prié le D^r Vaucel, alors directeur de l'Institut Pasteur de Brazzaville, de procéder lui-même à la sélection d'un certain nombre d'autres sujets, non vaccinés et non allergiques, et de les vacciner par voie buccale en leur faisant absorber les mêmes doses qu'aux nouveau-nés et dans les conditions prescrites pour ceux-ci (3 centigrammes de BCG en trois doses de 1 centigramme ingérées à quarante-huit heures d'intervalle, le matin à jeun, une demi-heure avant le premier repas).

Dans les deux écoles de garçons et de filles de Brazzaville, 149 sujets non allergiques ont été vaccinés de cette manière.

Trois mois après (juillet 1932), 82, soit 55 p. 100 réagissaient à la tuberculine. *La proportion des vaccinés per os, devenus allergiques en trois mois, était donc de 10 p. 100 supérieure à celle des vaccinés par voie sous-cutanée de 1931.*

63 non réagissants, conformément à nos instructions, furent vaccinés de nouveau par ingestion des mêmes doses. Trois mois après (novembre 1932), 16 d'entre eux se montraient positifs à l'épreuve tuberculinique, soit 25,4 p. 100.

Au total, sur 149 vaccinés *per os*, 98, soit 65,8 p. 100, ont manifesté leur état d'immunité, après trois mois pour 82 et après six mois pour 16.

Ce résultat est plein d'intérêt et d'enseignements.

Nous avons convenu, avec le D^r Boisseau, successeur du D^r Vaucel à la direction de l'Institut Pasteur de Brazzaville, que les sujets demeurés non allergiques après la deuxième vaccination *per os* seront revaccinés une troisième fois dans les mêmes conditions. Il est possible que cette troisième revaccination triomphe des dernières résistances à l'allergie, mais si celle-ci refuse de se manifester, on ne peut pas en conclure que les non allergiques persistants n'ont pas acquis l'immunité. On ne serait fondé à l'admettre que si l'un d'entre eux venait à contracter la tuberculose dans l'avenir. Jusqu'à présent, aucun sujet vacciné, soit par voie sous-cutanée, soit *per os*, n'est devenu tuberculeux.

Ensuite, nous avons décidé d'entreprendre une nouvelle série d'expériences ayant pour but de réaliser la vaccination par une seule ingestion d'une plus forte dose de BCG : 5 centi-

grammes ou même 10 centigrammes. Si, à la suite de cette ingestion unique, on constate l'apparition de l'allergie dans une proportion sensiblement égale à celle qu'on observe après l'absorption *per os* de trois doses fractionnées de 1 centigramme chacune, on disposerait d'une méthode de vaccination infiniment plus pratique, plus simple et tout aussi inoffensive, car nous nous sommes assurés récemment (expériences encore inédites) avec Wilbert, J. Troisier et A. Saenz, que les chimpanzés d'une part, les sujets adultes humains d'autre part, peuvent ingérer, sans en éprouver le moindre malaise, — pas même de diarrhée, — jusqu'à 1 gramme de BCG en une seule prise!

Actuellement, divers essais dans ce sens se poursuivent à Brazzaville, à Dakar, à Kindia, avec le concours des filiales de l'Institut Pasteur, et aussi sous la haute direction du professeur Charles Nicolle, à Tunis, du D^r Edmond Sergent et des D^{rs} Foley et Parrot, parmi les populations des territoires du Sud-Algérien.

Si, comme tout le fait prévoir, leurs résultats sont aussi satisfaisants que ceux qui nous sont déjà connus, il faudra se décider à pratiquer le plus largement possible la prémunition des sujets non réagissants, en s'adressant d'abord aux enfants d'âge scolaire, parmi lesquels les non allergiques sont encore très nombreux à cinq ou six ans, même dans nos pays européens de vieille civilisation. Ce n'est, en effet, qu'en allergisant au plus vite tous ceux qui n'ont pas encore subi la contagion bacillaire qu'on luttera rationnellement et efficacement contre la tuberculose. Sans doute les mesures d'hygiène sont nécessaires pour mettre obstacle aux contacts répétés et aux infections massives. Mais la vaccination préventive ou prémunition est seule capable de mettre les organismes en état de résister aux infections et aux surinfections virulentes qui surviennent à l'improviste, de sources trop souvent insoupçonnées.

NÉCESSITÉ DE PRÉMUNIR PAR LE BCG
LE PERSONNEL DES ÉTABLISSEMENTS HOSPITALIERS
ET LES ÉTUDIANTS EN MÉDECINE.

Dès à présent, sans plus attendre, on devrait envisager la mise en pratique régulière de la prémunition dans certains

groupes d'êtres humains particulièrement exposés à contracter la tuberculose, tels les membres du personnel des services hospitaliers, les religieuses ou infirmières de sanatoriums et les étudiants en médecine.

Nous possédons déjà une magnifique expérience, qui se poursuit en Norvège depuis 1927, sur la vaccination BCG des élèves infirmières et des étudiants. Elle est due aux D^{rs} O. Scheel et J. Heimbeck. Les lecteurs de ces *Annales* (1) en ont eu connaissance, mais si elle n'est pas ignorée des administrations sanitaires, celles-ci n'en ont tiré jusqu'à présent aucun profit.

Rappelons qu'à l'Hôpital-École Ulleval, à Oslo, où entrent chaque année environ 120 élèves infirmières qui, pendant leurs stages de trois ans, donnent leurs soins aux 3.400 malades tuberculeux de ce vaste établissement, on avait d'abord constaté que 454 élèves avaient réagi positivement à la tuberculine lors de leur admission, tandis que 253 étaient négatives. Or, sur les 454 Pirquet *positives*, on a relevé 12 cas de morbidité tuberculeuse, la plupart bénins, soit 2,6 p. 100. Sur les 253 Pirquet *négatives*, il s'en est produit dans le même temps 75 cas, soit 29,6 p. 100.

En présence de ces faits, on a résolu, à partir de 1927, de vacciner au BCG les Pirquet *négatives*, c'est-à-dire les *non allergiques*. Cette vaccination fut effectuée par une seule injection sous-cutanée. Sur 104 élèves devenues allergiques à la suite de celle-ci, 3 seulement ont été atteintes de quelque affection de nature tuberculeuse (érythème noueux, pleurésie sèche, etc.). Parmi 60 négatives, suivies dans le même temps et non vaccinées au BCG, 16 ont présenté des atteintes plus ou moins graves.

L'expérience se poursuit et, jusqu'à présent, la conclusion de J. Heimbeck est qu'il faut vacciner et revacciner les élèves infirmières à réaction de Pirquet négative jusqu'à ce qu'elles soient devenues allergiques.

*
* *

O. Scheel s'est occupé plus spécialement des étudiants en médecine. Sur 176 *allergiques*, la morbidité tuberculeuse fut

(1) Ces *Annales*, 42, 1928, p. 170 et 956. Suppl. mai 1932, p. 228 et *La Presse Médicale*, 1932, n° 28, 528.

seulement de 2 p. 100 par année d'observation. Sur 82 *non allergiques*, cette morbidité a été, dans le même temps et dans les mêmes conditions, de 5,6 p. 100, et sur 99 allergisés par le BCG, de 2,3 p. 100.

Si l'on se reporte aux recherches récemment effectuées sur l'infection tuberculeuse parmi les étudiants en médecine, notamment aux États-Unis, par Herman, Baetjar et Doull à l'Université John Hopkins, de Baltimore, et par J. Steidl à l'Université Harvard, on constate que la plupart des étudiants « négatifs » à leur arrivée, sont devenus « positifs » à la fin de leur troisième année d'études et que ceux qui, au début, avaient une réaction faible, en ont une plus forte à la fin de leurs études. A John Hopkins, de 1926 à 1931, 40 p. 100 des nouveaux arrivants étaient « négatifs ». 10 sont devenus tuberculeux pendant leurs études. Un d'entre eux seulement avait été exposé à un contact familial. Les 9 autres se sont probablement infectés à l'Université.

Il apparaît donc certain qu'il serait au moins recommandable d'instituer, avant l'entrée des étudiants dans les Facultés de Médecine, l'obligation d'un examen médical comportant, en ce qui concerne le dépistage de la tuberculose, une épreuve tuberculinique et, si celle-ci est positive, un examen clinique, radioscopique et bactériologique complémentaire.

Si la réaction tuberculinique est négative, on ne devrait admettre l'étudiant à commencer ses stages hospitaliers que cinq semaines après qu'il aurait été vacciné au BCG par voie sous-cutanée, ou, plus simplement, par la voie buccale, selon la technique que nous avons exposée dans les pages qui précèdent. Si cette mesure était régulièrement mise en pratique, — et elle devrait être complétée par l'obligation rigoureuse, pour chaque étudiant en médecine, d'être vacciné contre la variole, la diphtérie et la fièvre typhoïde, — beaucoup de vies humaines, parmi les plus précieuses au point de vue social, seraient sauvées.

SUR LES SÉRUMS ANTILYTIQUES

par les D^{rs} JULES BORDET et ERNEST RENAUX.

(*Institut Pasteur de Bruxelles.*)

On sait qu'en injectant aux animaux des principes lytiques, on obtient souvent des sérums antilytiques. Ce fait a été signalé, en premier lieu, par Bordet et Ciuca, en 1921 (1). Ces auteurs ont constaté que le pouvoir antilytique résiste au chauffage à 56°-60°, ce qui constitue une objection à la théorie du virus bactériophage. En effet, cette température qui respecte les anticorps supprime l'activité bactéricide du sérum et l'on ne conçoit guère qu'un sérum chauffé puisse détruire un virus. Il a été reconnu dans la suite que certains bactériophages se prêtent mieux que d'autres à l'obtention de sérums antilytiques très actifs.

Les recherches de Bordet et Ciuca concernaient un principe lytique pour le *B. coli*. Elles ont démontré que si l'on ensemence ce microbe dans du bouillon contenant, outre le principe, une dose suffisante du sérum antilytique correspondant, la culture se développe abondamment sans trahir aucune lyse, et que les repiquages en série de cette culture donnent des cultures filles absolument normales, parfaitement exemptes de principe. Bien entendu, si la dose de sérum mise en œuvre est trop faible, le principe lytique n'est que partiellement neutralisé et peut être récupéré avec sa puissance première par des passages en série sur la bactérie sensible.

Mais la question s'est compliquée d'une donnée mise en évidence dans la suite par Bordet (2), à savoir que le principe initial utilisé dans les expériences ci-dessus rappelées est, en réalité, constitué de deux principes distincts, et qu'un rapport très remarquable unit ce fait de la dualité des principes à la

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, **84**, janvier 1921.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, **87**, octobre 1922, p. 987, et *Ces Annales*, 1925.

notion de l'existence de deux types microbiens bien tranchés qui se retrouvent couramment dans les cultures de *B. coli*, le type bombé ou lisse (Smooth) et le type plat ou rugueux (Rough). L'un des principes, en effet, lyse énergiquement le type bombé, mais respecte le type plat. Tenant compte de ce qu'il ne lyse qu'une des deux races, Bordet l'appela principe faible. L'autre principe les attaque toutes les deux, c'est pourquoi il a été appelé principe fort.

Il résulte évidemment de ces conditions qu'un sérum antilytique capable de neutraliser le principe fort, mais qui n'exercerait pas d'influence sur le principe faible, et qu'on introduirait dans un tube de bouillon additionné du principe initial, qui est mixte, permettrait au *B. coli* ensemencé dans ce mélange de se multiplier sans manifester de lyse. En effet, la culture employée pour l'ensemencement contient les deux races, dont l'une, le type plat, tolère le principe faible. Il est vrai que la culture obtenue dans de pareilles conditions serait constituée uniquement du type plat, ne serait donc pas tout à fait identique à la culture ensemencée où les deux types coexistent. Mais cette particularité risquait autrefois de passer inaperçue, car à l'époque des premières recherches relatives aux sérums antilytiques, l'attention n'était pas encore vivement attirée sur les caractères différentiels des deux types de *B. coli*.

En conséquence, il convient actuellement de reprendre la question de savoir si les deux principes particuliers, présents dans le principe initial (que nous appellerons total ou mixte), se laissent réellement neutraliser tous deux par le sérum des lapins injectés de ce principe total.

Nous avons exposé dans plusieurs de nos mémoires la technique (1) qui permet l'isolement des deux principes, faible et fort, et leur entretien à l'état pur. Rappelons qu'on régénère le principe faible en faisant intervenir le *B. coli* de type bombé, tandis que pour reproduire le principe fort on le fait agir sur le type plat. Pour perpétuer le principe total, on l'introduit dans une suspension en bouillon de culture de *B. coli*, longtemps entretenue au laboratoire sans être soumise à l'isolement

(1) Nous rappelons brièvement cette technique dans la note intitulée « Races microbiennes et diversité des principes autolytiques », publiée récemment dans ces *Annales* (novembre 1932).

et qui, par conséquent, contient les deux types en proportion comparable.

Ces divers principes sont, après filtration, injectés à plusieurs reprises à des lapins, que l'on saigne une semaine environ après la dernière injection. Il semble ainsi que les divers sérums obtenus seront, corrélativement à la nature des liquides injectés, capables respectivement de neutraliser soit le principe faible, soit le principe fort, soit le principe total c'est-à-dire à la fois les deux principes. On éprouve les sérums après les avoir chauffés une demi-heure à 56°.

Or, et ce fait est vraiment inattendu, aucun des trois sérums ne neutralise le principe faible. Vis-à-vis de celui-ci, ces sérums se comportent comme du sérum de lapin neuf. Introduits même à forte dose dans un tube de bouillon additionné d'une trace de principe faible, et qu'on ensemence quelque temps après d'une goutte de culture du type bombé, il ne modifient en rien le phénomène auquel le principe faible donne régulièrement lieu, à savoir l'apparition d'une culture du type plat. Le principe détruit comme on sait les germes de type bombé ensemencés, seules survivent les rares unités investies de l'aptitude à la mutation, c'est-à-dire capables de fournir une descendance de type plat.

L'inoculation du principe faible ne provoque donc pas l'apparition d'un anticorps neutralisant. Il en va tout autrement du principe fort. Comme on peut s'y attendre, le sérum des lapins injectés de principe faible pur ne neutralise aucunement le principe fort. Mais le sérum des animaux qui ont reçu soit ce principe fort à l'état pur, soit le principe total, se montre à son égard puissamment antilytique. Dans un tube de bouillon additionné d'une goutte de principe fort, il suffit d'ajouter V à X gouttes d'un tel sérum pour que le principe soit complètement et définitivement inactivé. La protection assurée par le sérum s'observe quel que soit le type microbien, bombé ou plat, que l'on a ensemencé. Repiquée en série en bouillon, la culture obtenue donne des cultures filles exemptes de lyse et dans lesquelles on ne retrouve pas le principe. En effet, le filtrat de ces subcultures n'impressionne aucunement ni le type plat ni le type bombé. On démontre, au surplus, que les cultures développées en présence de principe que le sérum a neu-

tralisé sont parfaitement normales, c'est-à-dire ont gardé toute leur sensibilité originelle vis-à-vis du principe. S'il s'agit du type bombé, elles sont lysables par le principe faible et par le principe fort ; s'il s'agit du type plat, elles se lysent par le principe fort. Ajoutons encore que le principe fort garde ses caractères propres, notamment son aptitude à être neutralisé par le sérum en question, quel que soit le type microbien mis en jeu pour sa régénération. Nous le rapportons d'habitude, comme nous venons de le rappeler, à l'intervention du type plat. Mais si on le reproduit en lui faisant subir six passages successifs en bouillon ensemencé de type bombé, il reste ce qu'il était, et notamment se montre encore aussi aisément neutralisable que s'il avait été mis en présence du type plat.

Ce fait qu'on n'obtient pas d'immunsérum capable de neutraliser le principe faible permet d'obtenir très facilement celui-ci aux dépens du principe total anti-*coli*. Il suffit d'ajouter à ce principe total du sérum de lapin immunisé contre ce même principe mixte. Le sérum n'agissant que sur le principe fort, le principe faible se retrouve à l'état pur.

*
* *

Il semble résulter de ces faits qu'à l'inverse du principe fort, le principe faible n'est pas antigène. Cependant, on ne se résout pas facilement à accepter cette conclusion. Assurément, les deux principes sont distincts, on les reconnaît aisément par leur action sur les deux types microbiens, mais il serait pourtant étrange qu'ils fussent de nature tellement différente qu'une propriété essentielle, celle d'être antigène, se constatât chez l'un d'eux et non chez l'autre. Ne peut-on supposer que la potentialité antigénique existe foncièrement chez les deux principes, mais que, pour se manifester, elle exige certaines conditions qui ne sont convenablement réalisées que chez l'un d'eux ? Ne peut-on pas se demander, notamment, si les principes ne fonctionnent pas beaucoup plus activement comme antigènes lorsqu'ils sont fixés sur des microbes ou des matériaux microbiens colloïdaux ?

Dans les expériences précédentes, montrant que contrairement au principe fort, le principe faible ne provoque pas l'éla-

boration d'anticorps, on avait injecté aux animaux des principes filtrés. Il convient de rechercher si l'injection de principe faible non filtré donnerait encore ce résultat négatif. Selon la technique habituellement suivie pour la reproduction du principe faible, un tube de bouillon est additionné d'une trace de ce principe etensemencé d'une goutte de culture de *B. coli* de type bombé. Le principe se régénère, tandis qu'apparaît bientôt une culture abondante de *B. coli* du type plat. On injecte le liquide non filtré, à la dose de 2 cent. cubes, à des lapins qui ultérieurement reçoivent encore plusieurs injections identiques. Or, le sérum obtenu dans ces conditions n'est pas totalement inactif, mais son pouvoir antilytique est fort peu prononcé; en effet, X gouttes d'un tel sérum n'entravent que partiellement les effets de 1/100 de goutte de principe faible. Il est superflu d'ajouter que les lapins-contrôles injectés des mêmes liquides, sauf que ceux-ci ont été filtrés, fournissent un principe inactif.

Il semble donc que l'aptitude antigénique du principe est, sinon prononcée, au moins appréciable, si les animaux reçoivent des débris microbiens chargés de ce principe et qui ne traversent pas aisément les filtres. Mais il importe de remarquer que la quantité de ces débris doit être très minime lorsque le principe faible est préparé comme il vient d'être dit, c'est-à-dire en ensemençant de I goutte de culture du type bombé un tube de bouillon additionné d'une trace de principe. Dans ces conditions, en effet, la multiplication des germes de ce type, susceptibles de se lyser ultérieurement et de fournir des débris, est forcément très limitée du fait que bientôt s'effectue un abondant développement de microbes de type plat, qui épuisent le milieu nutritif, qui ne sont pas lysables et n'absorbent pas le principe. La fixation du principe sur des particules d'origine microbienne ne peut donc être que fort modérée. Mais on peut réaliser des conditions propices à une fixation plus importante, et l'on constate, comme nous allons le voir, qu'en pareil cas l'injection du liquide non filtré permet d'obtenir un sérum antilytique plus actif.

Reprenons une expérience relatée dans un récent mémoire (1) et qui consiste à ensemencher de I goutte de culture de *B. coli* de

(1) BORDET et RENAUX, *loc. cit.*, 1932.

type bombé un tube de bouillon dans lequel on a introduit, outre une trace de principe faible, une dose assez forte de microbes du même type, tués par le chauffage à 60°. Le tube étant mis à l'étuve, on constate au bout de quelques heures une forte agglutination des microbes tués, lesquels absorbent le principe faible au fur et à mesure qu'il se régénère. Il est probable au surplus qu'une fraction appréciable du principe néoformé étant ainsi soustraite au liquide, la multiplication des germes vivants de type bombé qui, dans la suite, subiront la lyse et libéreront des matériaux microbiens, n'est pas enrayée aussi promptement que si les microbes tués étaient absents. Or, on constate que l'injection au lapin d'un tel liquide, non filtré, provoque l'apparition dans le sérum d'un pouvoir antilytique, cette fois beaucoup plus net. Il suffit de X gouttes environ d'un tel sérum pour neutraliser complètement au moins 1/10 de goutte de principe faible, tandis que des lapins injectés d'un liquide identique sauf qu'il n'a pas été additionné de cadavres microbiens fournissent un sérum dont l'activité est nulle ou à peine perceptible. D'autre part, un simple mélange de principe faible filtré et de microbes tués n'est pas davantage antigène. On sait d'ailleurs que les microbes tués ne sont pas lysables.

En somme, il apparaît clairement que l'aptitude antigénique des principes est liée à leur absorption par des matières finement divisées d'origine microbienne. Mais pourquoi, s'il en est ainsi, le principe fort est-il si nettement doué de la qualité antigénique même lorsqu'il a été filtré, tandis qu'après filtration cette propriété ne se retrouve pas chez le principe faible? L'explication la plus plausible est très simple. Le principe faible agglutine énergiquement, même lorsqu'ils sont tués, les microbes appartenant à la race sensible à son action. Le principe fort ne produit pas cet effet. En conséquence, il est hautement probable que, dans le cas du principe faible, mais non dans celui du principe fort, les débris microbiens issus de la lyse sont agglutinés, de sorte qu'ils sont arrêtés par le filtre, d'où la différence si marquée des filtrats au point de vue du pouvoir antigène.

On retrouve ainsi cette notion que la propriété antigénique est en rapport avec l'état colloïdal de la matière et se prononce

beaucoup lorsque celle-ci est suffisamment condensée. Pour ce qui concerne la tuberculine, on incline à penser que ce produit obtenu *in vitro* aux dépens de cultures stérilisées ne se trouve pas au même état qu'*in vivo*. Lorsqu'il apparaît dans le tissu tuberculeux, il se trouve probablement uni à certains matériaux colloïdaux qui favorisent le pouvoir antigène.

Enfin, l'absorption des principes lytiques par des débris microbiens qui en deviennent le substrat, permet de comprendre plus aisément pourquoi ils se comportent, quoique n'étant pas des virus, comme s'ils étaient de nature corpusculaire.

**VARIATIONS DU *B. COLI*
ET HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PRINCIPES LYTIQUES
CORRESPONDANTS**

par ANDRÉ GRATIA.

(*Laboratoire de Bactériologie
de la Faculté de médecine de Liège.*)

Il y a dix ans, dans les Comptes rendus de la Société de Biologie [1], j'ai consacré une série de trois notes aux relations que j'ai trouvées entre l'hétérogénéité du *B. coli* et l'hétérogénéité des principes lytiques correspondants. Ces notes ont été mal interprétées par divers auteurs, et récemment encore par Bordet et Renaux dans un mémoire paru dans ces *Annales* [2]. Dans ces conditions, je me propose de m'expliquer clairement ici en regroupant dans une brève récapitulation mes principales idées sur cette notion.

A l'origine, Bordet et Ciuca [3] avaient observé que dans les conditions où leur principe anti-*coli* très actif agissait à l'état de traces — dans le dernier tube d'un titrage par exemple — le principe régénéré paraissait très affaibli en ce sens qu'il n'exerçait plus qu'une inhibition passagère permettant l'apparition précoce d'une culture résistante du type agglutiné (Rough). Ils en déduisaient qu'un même principe *initialement fort* subissait une variation d'énergie, une modification qualitative, bref *devenait faible*, lorsque très peu de ce principe agissait sur relativement beaucoup de microbes. Le principe initial dilué à l'extrême se répartissant ainsi sur trop de microbes ne pouvait influencer que faiblement ceux-ci, et en retour ceux-ci ne pouvaient plus fournir qu'un principe affaibli, explication conforme à la théorie défendue par Bordet et Ciuca du bactériophage sécrétion microbienne.

Des doutes me vinrent sur cette explication. Le fait observé par Bordet et Ciuca n'était pas général : je ne le constatais pas

notamment avec les principes lytiques du staphylocoque. De plus, en soumettant à un deuxième titrage le principe faible régénéré dans le dernier tube du premier titrage, il fallait s'attendre à voir le dernier tube de ce deuxième titrage donner, pour la même raison, un principe encore plus faible. Or, cette éventualité, je n'ai pu la vérifier : le principe faible issu du dernier tube d'un premier titrage pouvait supporter de nouveaux titrages sans s'affaiblir davantage et se comportait donc comme mes principes staphylococciques. C'est alors qu'une autre explication me vint à l'esprit. Le principe originalement fort de Bordet et Ciuca ne serait-il pas un *mélange* de deux principes distincts dont l'un se régénérant moins abondamment que l'autre, ne se retrouverait plus dans le dernier tube du titrage où seul l'autre, le plus abondant, resterait à l'état pur ?

Dans le but de vérifier cette hypothèse, j'ai essayé avec L. de Kruif de séparer ces éventuels principes par la méthode d'isolement des taches claires. Nous avons fait ainsi de multiples tentatives sans aboutir tout d'abord à une vérification de mon hypothèse, et dans notre première note à la Société belge de Biologie [1 a] nous pensions pouvoir y renoncer en faveur de l'interprétation de mon Maître. Celui-ci [4], d'ailleurs, avait insisté, dans l'entre-temps sur l'invraisemblance de l'existence dans le principe initial de virus de virulences différentes.

Or, quelque temps après, je rencontrais accidentellement ce que pendant si longtemps j'avais vainement cherché. Sur une boîte de Petri, où une culture sensible de *B. coli* avait poussé en présence d'une dilution convenable du principe initial de Bordet et Ciuca, je vis à la loupe, à côté des taches habituelles, bien visibles, des taches minuscules presque imperceptibles à l'œil nu, et sensiblement moins nombreuses que les grandes taches. Je retrouvais, en somme, le fait observé déjà par Bail [5] pour le B. de Shiga et par Asheshov [6] pour le B. de Flexner, de la dissociation d'un bactériophage en deux types faisant l'un des grandes taches et l'autre des petites. Ayant procédé à l'isolement très facile des grandes taches d'une part, et à l'isolement beaucoup plus délicat, presque acrobatique, des petites taches d'autre part, je constatai que le principe à grandes

taches correspondait au principe faible de Bordet et Ciuca, c'est-à-dire qu'il laissait rapidement se développer une culture secondaire agglutinée. Quant au principe à petites taches, c'était un principe nouveau non décrit par Bordet et c'est ce principe-là — et non plus le principe initial — que Bordet et Renaux appellent aujourd'hui leur principe fort. Comme le principe à grandes taches, dit faible, mon principe à petites taches permettait lui aussi une culture secondaire précoce, mais les résistants étaient cette fois du type diffus (Smooth). Je constatais de plus que mon principe à petites taches lysait fort bien la culture secondaire agglutinée résistante au principe à grandes taches et, réciproquement, ce dernier lysait fort bien la culture secondaire diffuse résistante au principe à petites taches. Les résistants à l'un des principes pouvaient être dissous par l'autre et réciproquement ; il s'agissait donc de deux principes partiels et complémentaires. Il suffisait de les mélanger pour obtenir de nouveau une inhibition quasi complète et prolongée de la culture de *B. coli* et reconstituer le principe original ou ancien principe fort de Bordet et Ciuca. Après avoir fait l'analyse de celui-ci, j'en faisais la synthèse et confirmais ainsi entièrement mon hypothèse de l'existence dans le principe original *de deux principes distincts* [1 b].

Quant aux deux variétés de *B. coli*, l'agglutinée et la diffuse, respectivement résistantes au principe à grandes taches et au principe à petites taches, elles préexistaient avec leur résistance respective dans la culture primitive avant toute intervention de principe lytique. Ce fait, soit dit en passant, confirmait entièrement la thèse que je défendais dès 1921 sur le rôle essentiel joué par la sélection dans l'adaptation des microbes au bactériophage [7]. La culture primitive soumise à l'isolement donne les deux types *R* (agglutiné) et *S* (diffus) d'Arkwright. En repiquant plusieurs colonies *R*, j'obtenais des cultures agglutinées sensibles au principe à petites taches et comme Bordet l'avait déjà constaté [4] résistantes au principe à grandes taches dit faible. En repiquant plusieurs colonies *S*, j'obtenais des cultures diffuses dont certaines étaient sensibles au principe à grandes taches et résistantes au principe à petites taches et dont d'autres étaient *sensibles aux deux principes*. Le principe à petites taches, bien que plus particulièrement appro-

prié au *B. coli* du type agglutiné, pouvait donc étendre son champ d'action à des individus du type diffus [1 c]. Contrairement à l'opinion que Bordet et Renaux m'attribuent dans une note au bas d'une page de leur mémoire (p. 550), je n'ai donc pas isolé du principe initial, un principe inactif sur la variété S (diffuse) de *B. coli*. Telle n'ayant jamais été mon opinion, je constate que nous sommes donc au contraire parfaitement d'accord sur ce fait. Le champ d'action du principe à petites taches était donc plus étendu que celui du principe à grandes taches. C'est pour cela qu'à présent, Bordet et Renaux donnent à ce principe à petites taches le nom de principe fort que jadis Bordet et Ciuca réservaient au principe initial.

En vérité, les termes faible et fort, légitimes tant qu'il s'agissait des variations d'énergie d'un principe unique, ne me paraissent plus se justifier aujourd'hui qu'il s'agit en somme de deux principes, peut-être de même origine, mais séparables et distincts, tant par leur action que par leurs propriétés antigéniques [1 b], et qui ont simplement un champ d'action différent. Comment d'ailleurs considérer logiquement comme fort, précisément celui des deux principes qui, se régénérant de façon moins abondante, moins rapide et moins intense, ne pouvait faire que des taches minuscules. D'ailleurs, en ce qui concerne le principe à grandes taches considéré comme faible parce que son champ d'action était limité au seul type diffus, j'étais arrivé, au moment où j'ai renoncé à ces recherches, à étendre aussi son champ d'action au type agglutiné. A mon retour de vacances, du principe à grandes taches dit faible, après un séjour prolongé dans une culture du type agglutiné, était devenu capable de faire quelques taches, d'ailleurs grandes, sur une culture de ce *B. coli* agglutiné. Profitant de cette légère action, je fis des passages sur cette souche agglutinée. Le nombre des taches augmentant après chaque passage, ce principe à grandes taches considéré comme faible, était finalement devenu capable de faire une traînée confluyente à la fois sur les deux variétés R et S de *B. coli*, c'est-à-dire de se comporter à cet égard, comme le principe dit fort. La notion de principe fort et de principe faible est donc toute relative. Il n'est d'ailleurs pas impossible que les deux principes aient une origine commune et puissent éventuellement se transformer

l'un en l'autre au même titre que le font les deux variétés R et S de *B. coli* auxquelles ils sont plus particulièrement appropriés.

Quoi qu'il en soit, la découverte que j'ai faite de mon principe à petites taches a substitué à la notion d'un principe unique subissant des variations d'énergie, celle de deux principes distincts actuellement admise par Bordet et Renaux. A l'hétérogénéité du *B. coli* correspond une hétérogénéité des principes lytiques, notion importante qui par ailleurs ne préjuge en aucune façon de la nature du bactériophage et qui s'harmonise à merveille, en la complétant, avec celle de la pluralité des principes lytiques. Avec Jaumain, en effet, nous avons tout d'abord montré qu'à des espèces microbiennes aussi éloignées que le *B. coli* et le staphylocoque correspondent des principes lytiques différents [8]. Plus tard, Bruynoghe et Appelmans (9), pour le *B. typhique* et moi-même avec De Namur [10], pour le staphylocoque, constatons que des principes lytiques différents peuvent aussi exister pour les microbes d'une même espèce. Enfin, dernier échelon, nous voyons que pour une même souche microbienne se dissociant en deux types de microbes, R et S, existent des bactériophages distincts.

Le lecteur que la question intéresse pourra suivre toute l'évolution de ces idées dans les notes publiées à la Société de Biologie et rappelées dans la bibliographie ci-dessous.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. GRATIA. a) avec L. de Kruif, *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 1923, p. 629; b) *C. R. Soc. Biol.*, **89**, p. 821; c) *C. R. Soc. Biol.*, **89**, 1923, p. 824.
- [2] BORDET et RENAUX. *Ces Annales*, **49**, novembre 1932, p. 545.
- [3] BORDET et CIUCA. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 366.
- [4] BORDET. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 987.
- [5] BAIL. *Wiener Klin. Wochens.*, nos 20 et 27, 1921, nos 6 et 8, 1922.
- [6] ASHESHOV. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 1342.
- [7] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, **84**, 1921, p. 36.
- [8] A. GRATIA et D. JAUMAIN. *C. R. Soc. Biol.*, **85**, 1921, p. 882.
- [9] BRUYNOGHE et APPELMANS. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 96; BRUYNOGHE. *Acad. roy. de méd. de Belgique*, juin 1923.
- [10] A. GRATIA et DE NAMUR. *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 99 et 364; A. GRATEA. *Ces Annales*, 1931, p. 941.

SUR LE MÉCANISME DE L'INFECTION CHARBONNEUSE

par A. BOQUET et A. SAENZ.

(*Institut Pasteur.*)

Jusqu'à ces dernières années, on considérait la bactériémie charbonneuse comme le prototype des microbes pathogènes dont l'aptitude à végéter dans les tissus de leurs hôtes et à y produire des altérations plus ou moins graves, définit et mesure la virulence. On avait démontré qu'elle ne traverse ni la peau, ni les muqueuses intactes, mais qu'une trace de culture ou de sang infecté provoque à bref délai un charbon mortel lorsqu'on la dépose sur une plaie vive. On reproduisait encore la maladie à coup sûr en inoculant le virus dans le tissu conjonctif sous-cutané, dans les muscles, les vaisseaux, les séreuses, etc., et l'on admettait comme un fait d'évidence que les germes du charbon prolifèrent dans le tissu contaminé, quel qu'il soit, pénètrent dans la circulation lymphatique, puis dans la circulation sanguine, et entraînent la mort par leur extraordinaire pullulation. Toutes ces acquisitions, qui semblaient définitives, durent cependant être revisées à la lumière des travaux de A. Besredka.

En inoculant à des cobayes et à des lapins, par voie péritonéale ou veineuse, plusieurs doses réputées mortelles de bactériémies, Besredka constata, en effet, que ces animaux, au lieu de contracter le charbon, comme on devait s'y attendre, restaient toujours indemnes lorsqu'on avait pris la précaution de ne pas contaminer leur peau. Par contre, une légère friction de la peau fraîchement rasée avec un tampon imbibé de culture virulente, ou l'injection d'une faible dose de virus dans l'épaisseur du derme suffit pour produire en quelques jours un charbon septicémique.

Il apparaissait ainsi « qu'il existe un organe de prédilection pour lequel la bactériémie ressent une réelle affinité, un organe dans lequel elle peut s'implanter, au sein duquel elle peut

croître, se multiplier et sécréter de la toxine : c'est la peau. En dehors de la peau, la bactériodie se comporte comme un germe saprophyte. Il faut croire que la bactériodie, qui pénètre ailleurs que dans la peau, passe inaperçue de l'animal; dès qu'elle pénètre dans l'organisme, elle est aussitôt phagocytée et digérée. »

Cette conception vraiment originale eut pour effet de susciter une multitude d'expériences dont nous aurons l'occasion de citer les plus démonstratives en exposant nos propres recherches sur quelques points particuliers de la pathogénie du charbon.

I. — Infection par voie sous-cutanée.

« Si c'est la peau proprement dite qui participe à l'infection, le virus introduit sous la peau, c'est-à-dire dans le tissu cellulaire, doit être inoffensif. Le problème se réduisait donc à ceci : faire pénétrer le virus dans le tissu sous-cutané sans toucher à la peau. »

Franchir ce mur sans laisser la moindre trace de l'effraction n'est pas chose facile. Pourtant, on pouvait emprunter la voie détournée des muqueuses; mais cet artifice parut sans doute négligeable à Besredka, tant l'idée s'était imposée à son esprit que la peau seule est vulnérable à la bactériodie.

Pour essayer de résoudre ce problème, Balteano et Plotz introduisent sous la peau de petites ampoules ou des tubes capillaires chargés de cultures virulentes, et quelques jours plus tard, quand la blessure cutanée est bien cicatrisée, ils en libèrent le contenu en les brisant. Un grand nombre de lapins ainsi inoculés restèrent indemnes, mais tous ceux dont la plaie opératoire n'était pas entièrement guérie moururent de charbon. D'autre part, l'inoculation du contenu de quelques ampoules laissées en place pendant le même délai ayant démontré que le virus avait conservé toute son activité, il ressortait nettement des expériences de Balteano et de Plotz que les bactériodies « se montrent inoffensives dès qu'elles se trouvent dans le tissu cellulaire sous-cutané, isolées de la peau proprement dite. »

En vérité, si grande qu'apparaisse sa réceptivité au charbon, la peau ne se prête pas avec la même facilité, dans toutes les régions du corps, au développement de la bactériémie. Alors que le dépôt d'une goutte de deuxième vaccin charbonneux sur une scarification fraîche de la peau du ventre, par exemple, entraîne régulièrement la mort du cobaye en deux ou trois jours, la même inoculation, effectuée au niveau de la plante d'une des pattes postérieures, est souvent inopérante.

De même, chez la souris, le derme de la queue se montre relativement peu favorable à l'infection. Si, en effet, une simple piqûre de l'extrémité de cet organe, au moyen d'une aiguille chargée d'une suspension très épaisse de bactéries (X gouttes de solution de Locke pour un tube de culture sur gélose de deuxième vaccin) détermine rapidement un charbon septicémique, l'inoculation au même point de 0 c. c. 01 de deuxième vaccin sous le volume de 0 c. c. 1 ne tue plus que 7 ou 8 animaux sur 10. Cette inoculation, qui nécessite une pression considérable en raison de la densité du tissu, provoque des décollements tels, sur une longueur de 10 à 20 millimètres, que de fines gouttelettes suintent à-travers la peau. Bien que le derme se trouve ainsi abondamment souillé de dehors en dedans par la piqûre, et de dedans en dehors par le liquide virulent qui transsude, l'infection avorte dans quelques cas.

Quel est le sort des bactéries introduites dans le derme et dans le tissu cellulaire sous-jacent ? Comment et par quelle voie se disséminent-elles dans l'organisme pour se multiplier finalement dans les viscères et dans le sang avec la prodigieuse intensité que l'on sait ? Voici à ce propos ce que plusieurs expériences nous ont permis de constater (1).

EXPÉRIENCE I. — On inocule à des souris, vers l'extrémité de la queue, 0 c. c. 1 de deuxième vaccin charbonneux. Puis cinq, dix, quinze, vingt, trente, quarante, cinquante et soixante minutes plus tard, on ampute l'organe à sa base.

Les souris dont la queue avait été amputée plus de trente minutes après cette inoculation intradermique et sous-cutanée

(1) Le deuxième vaccin charbonneux nous a été aimablement fourni par notre collègue M. Staub, à qui nous exprimons nos remerciements les plus cordiaux.

sont toutes mortes de charbon ; les autres n'ont présenté aucun trouble (1).

EXPÉRIENCE II. — Dix cobayes reçoivent dans le derme du flanc 0 c. c. 1 de deuxième vaccin charbonneux dont la dose mortelle minimum est de 0 c. c. 0005. Vingt, quarante, soixante minutes, deux, quatre, six et dix heures après, on excise la peau de la région inoculée, en débordant largement de 5 ou 6 millimètres la zone de diffusion du liquide virulent.

Tous les cobayes dont la peau avait été excisée soixante minutes ou plus après l'inoculation sont morts de charbon septicémique dans les mêmes délais que les témoins, avec œdème ou sans œdème autour de la plaie cutanée. Les animaux opérés à la vingtième minute et à la quarantième sont restés indemnes.

EXPÉRIENCE III. — On inocule à des cobayes, à l'extrémité d'une des pattes postérieures, à la base du doigt médian, 0 c. c. 2 d'une suspension virulente (1/5 environ de la rate d'un cobaye mort de charbon — deuxième vaccin — broyée et mise en suspension dans 20 cent. cubes d'eau physiologique). Quinze, trente, quarante-cinq, soixante, quatre-vingt-dix minutes, deux, quatre, six, sept, huit, dix, vingt-quatre heures après, on saigne ces animaux par ponction du cœur et on ensemence 6 à 8 cent. cubes de leur sang dans 50 cent. cubes de bouillon. On prélève ensuite aseptiquement le ganglion poplité de la patte inoculée et la rate, on les ensemence séparément après les avoir broyés avec du sable stérile et on en inocule une partie à des souris.

La présence de bactériidies dans le sang et dans la rate a été constatée à partir de la quatrième heure (4 h. 15). Par contre, l'ensemencement et l'inoculation des ganglions poplités, prélevés jusqu'à la septième heure inclusivement, sont restés négatifs, bien que ces organes fussent nettement hypertrophiés et ecchymotiques dès la quatrième heure.

Il semble donc que les bactériidies inoculées sous la peau se dispersent à bref délai par la voie lymphatique et par la voie sanguine. Dans les infections massives, du moins, leur passage dans le sang précède même de quelques heures l'envahissement des ganglions lymphatiques les plus proches.

On ne peut douter que la prolifération des germes dans le derme et le tissu cellulaire sous-cutané entretienne cette bac-

(1) En opérant avec un virus beaucoup plus actif, Schimmelbusch avait constaté, en 1893, que l'amputation de la queue, dix minutes après l'inoculation, n'empêche pas le développement du charbon chez la souris. Une demi-heure après l'infection, la présence de bactériidies dans les poumons, la rate et les reins, pût être décelée par la culture de ces organes.

tériémie; cependant les expériences effectuées sur la souris démontrent que la gravité du charbon dépend moins de l'activité du foyer local que de la contamination *précoce et massive* des viscères par le sang.

Par ailleurs, l'exemple de la pustule maligne chez l'homme, loin de justifier l'hypothèse d'une réceptivité élective du tégument, prouve, au contraire, que les réactions cellulaires dont la peau contaminée devient le siège, ont parfois pour effet de délimiter le champ de l'infection et de mettre obstacle à la dispersion des bactériidies ou de la restreindre à quelques éléments qui sont rapidement fixés et détruits dans la rate et dans le foie.

Il est vraisemblable que l'irruption des germes dans la circulation sanguine — en dehors de ceux que les leucocytes peuvent y transporter directement — s'effectue à la faveur d'une altération des capillaires par des substances toxiques élaborées dans le foyer initial, et que ces substances interviennent ultérieurement dans la production de l'immunité spécifique. Mais, sans méconnaître l'importance des recherches de Marmier, Henkin et Westbrook, Marxer, Bail, etc., sur ce sujet, on doit convenir que l'existence de toxines bactériidiennes authentiques n'a pas encore été démontrée.

RÉCEPTIVITÉ COMPARÉE DU DERME ET DU TISSU CONJONCTIF SOUS-CUTANÉ.

Tous les arguments que Besredka a développés pour appuyer sa théorie de la « cuti-infection » bactériidienne peuvent être appliqués à la réceptivité du tissu conjonctif. En effet, si le processus charbonneux débute dans le derme, il ne tarde pas à s'étendre au tissu cellulaire sous-jacent où les bactériidies finissent par pulluler avec la même abondance que dans les assises profondes de la peau. En outre, les lésions cutanées du charbon sont « superficielles et banales » (E. Rivalier), d'ordre inflammatoire ou nécrotique, et comparables à celles que produisent un grand nombre de bactéries à propos desquelles nul n'a songé, jusqu'ici, à faire intervenir des « cellules réceptives » particulières ou une « sensibilité élective » rigoureuse pour expliquer leur action pathogène.

Réserves faites sur la valeur des artifices employés par Bal-

teano et Plotz, il n'est guère possible d'atteindre les tissus profonds sans contaminer la peau : de sorte que si l'on admettait que le dépôt d'une trace de culture virulente sur une excoriation superficielle, fraîche, du tégument donne toujours le charbon au cobaye, l'étude de la réceptivité du tissu cellulaire sous-cutané apparaîtrait presque irréalisable.

Mais cette difficulté peut être tournée en substituant les bactéridies atténuées du deuxième vaccin aux bactéridies virulentes : une seule piqûre du derme, au moyen d'une aiguille de 8/10 de millimètre de diamètre, préalablement trempée dans ce vaccin, ne provoque pas le charbon chez le cobaye, même lorsqu'on souille la petite plaie cutanée en étalant à sa surface une goutte du même virus. Deux piqûres, par contre, infectent l'animal. Il suffit également de faire pénétrer de quelques millimètres l'aiguille souillée dans le tissu conjonctif, de décoller légèrement ce tissu par quelques mouvements de va et vient, ou de retraverser la peau de dedans en dehors pour produire à coup sûr l'infection.

En nous fondant sur ces constatations, nous avons pensé que l'on pouvait, sans donner prise à l'objection précitée, comparer avec une approximation suffisante la réceptivité propre du tissu conjonctif avec celle du derme.

EXPÉRIENCE IV. — Deux lots de cobayes de même poids reçoivent au même point de la région du flanc préalablement épilée, les uns dans le derme, les autres sous la peau, des quantités décroissantes de deuxième vaccin charbonneux : 0 c. c. 02, 0 c. c. 01, 0 c. c. 0025, 0 c. c. 001, 0 c. c. 0008, 0 c. c. 0005 et 0 c. c. 0003 sous le même volume (0 c. c. 1) de solution de Ringer-Locke. L'inoculation a été effectuée avec une très fine aiguille à intradermo-réaction tuberculinique (tableau I).

TABLEAU I.

LIEU de l'inoculation	DOSES INOCULÉES ET RÉSULTATS OBTENUS						
	0 c. c. 02	0 c. c. 01	0 c. c. 0025	0 c. c. 001	0 c. c. 0008	0 c. c. 0005	0 c. c. 0003
Derme. . .	+ en 3 j.	+ en 3 j.	+ en 4 j.	+ en 3 j.	+ en 4 j.	+ en 4 j.	Survit.
Tissu sous-cutané.	+ en 3 j.	+ en 4 j.	+ en 4 j.	Survit.	Survit.	Survit.	Survit.

Le deuxième vaccin charbonneux contenant environ 1.000.000 de germes par centimètre cube, il ressort de cette expérience que le tissu conjonctif sous-cutané est capable de détruire entre 1.000 et 2.500 spores et la peau moins de 500 seulement. Celles qui résistent, quel que soit leur siège, végètent sur place et provoquent un charbon qui évolue dans le même délai, si faible qu'ait été le nombre de germes inoculés.

Etant donné qu'une piqûre de la peau par une aiguille d'assez fort calibre souillée de deuxième vaccin ne donne pas le charbon, on peut admettre que, même si quelques spores refluent dans le canal tracé par une aiguille très fine, elles y parviennent en trop petit nombre pour déborder la « capacité défensive » du tégument. D'autre part, la minuscule blessure dermique qui résulte de l'inoculation sous-cutanée se comble en quelques heures, s'obstrue et devient ainsi, presque d'emblée, imperméable aux spores déposées dans le tissu cellulaire. Puisque néanmoins le charbon éclate, c'est donc dans ce tissu même que végètent les bactériidies et que se forme le foyer charbonneux initial, source de la bacillémie.

Le fait que les lésions hémorragiques ou nécrotiques de la peau, qui caractérisent l'infection par voie dermique, font presque entièrement défaut dans l'infection par voie sous-cutanée, vient encore appuyer cette conclusion.

II. — Infection par les muqueuses et par voie sous-muqueuse.

Dans les conditions naturelles, le charbon peut résulter de la souillure d'une plaie cutanée ou d'une piqûre; c'est le cas de la pustule maligne de l'homme et de certaines formes du charbon dit externe des herbivores. Mais ce mode d'infection n'intervient, en réalité, chez les animaux, que dans des circonstances assez exceptionnelles. Par contre, il ressort à la fois de l'observation clinique et des expériences anciennes de Pasteur, Chamberland et Roux, que l'ingestion de spores avec les aliments joue un rôle beaucoup plus important dans l'étiologie de la maladie.

En dépit de ces notions devenues classiques, Besredka ne fit jamais allusion à la vulnérabilité des muqueuses avant les

recherches de l'un de nous sur ce sujet. Plus exactement, il se croyait autorisé à l'exclure pour la réserver à la peau, en se fondant sur les expériences suivantes effectuées dans son laboratoire par M^{lle} Aïtoff.

A l'exemple de Römer et de Brusaferrö, M^{lle} Aïtoff essaya d'infecter des cobayes en déposant sur leurs conjonctives une goutte de suspension épaisse de bactériidies. Elle parvint à retrouver ces germes sur la muqueuse pendant quelques jours, mais, sauf sur deux femelles pleines, elle n'observa aucun signe de charbon sur les animaux ainsi inoculés. M^{lle} Aïtoff a constaté, en outre, que « la cautérisation artificielle de la conjonctive, ainsi que les ulcérations accidentelles de cette muqueuse, loin d'activer l'infection, provoque, au contraire, la disparition rapide de la bactériдие à la faveur de l'apparition de microbes banaux tels que le staphylocoque ».

Les résultats sont tout différents, comme nous allons le démontrer, lorsqu'on inocule le virus sous la muqueuse elle-même, c'est-à-dire dans le tissu cellulaire sous-muqueux.

A. — INOCULATION SOUS LA MUQUEUSE CONJONCTIVALE.

EXPÉRIENCE V. — Au moyen d'une fine aiguille à intra-dermo-tuberculination, on inocule à des cobayes, dans le tissu sous-conjonctival du cul-de-sac antérieur, 0 c. c. 02 de deuxième vaccin charbonneux dilué dans 0 c. c. 1 de solution de Ringer-Locke. Bien que, d'après les expériences mêmes de M^{lle} Aïtoff, la souillure d'une plaie conjonctivale par des bactériidies virulentes soit incapable de produire le charbon, on opère de façon à éviter le reflux du liquide sur la muqueuse perforée.

Les animaux ainsi inoculés sont morts de septicémie charbonneuse en quelques jours. Les lésions locales qu'ils présentaient étaient d'autant plus prononcées que l'infection avait évolué plus lentement. Chez les animaux qui avaient succombé en trois ou quatre jours, la muqueuse oculaire tuméfiée formait un volumineux bourrelet entre les paupières; un œdème caractéristique avait envahi les joues, le cou et, parfois, la région sternale.

B. — INOCULATION SOUS LA MUQUEUSE LINGUALE.

EXPÉRIENCE VI. — Les mâchoires étant doucement écartées et la langue immobilisée au moyen d'une pince à mors mousses, on inocule à des cobayes.

sous la muqueuse linguale, 0 c. c. 02 de deuxième vaccin charbonneux, dilué comme précédemment.

Tous ces animaux ont contracté le charbon. Chez ceux qui moururent après le troisième jour, la langue était tuméfiée et, au point de l'injection, un petit foyer nécrotique déprimait la muqueuse fortement congestionnée. Un œdème, d'autant plus important que la mort avait été plus tardive, infiltrait les lèvres, les narines, la gorge et le tissu cellulaire de la région inférieure du cou. Les ganglions sous-maxillaires et cervicaux supérieurs étaient hypertrophiés, hémorragiques, et les organes internes présentaient les altérations habituelles du charbon (1).

L'inoculation d'une dose égale du même virus sous la muqueuse de la joue a produit les mêmes effets.

C. — RÉCEPTIVITÉ COMPARÉE DU TISSU CELLULAIRE SOUS-MUQUEUX ET DE LA PEAU.

De même que pour l'infection par voie sous-cutanée, nous avons essayé de comparer, en ce qui concerne la rapidité et la régularité de leur évolution, le charbon provoqué par l'inoculation sous-muqueuse et le charbon qui fait suite à l'inoculation intradermique.

EXPÉRIENCE VII. — Trois lots de cobayes sont infectés, les uns par inoculation dans le tissu cellulaire sous-conjonctival du cul-de-sac antérieur, les autres dans l'épaisseur de la langue et les derniers dans le derme du flanc, de quantités décroissantes de deuxième vaccin charbonneux, au moyen d'une fine aiguille à intradermo-tuberculation : 0 c. c. 02, 0 c. c. 01, 0 c. c. 0025, 0 c. c. 001, 0 c. c. 0008 et 0 c. c. 0005 sous le même volume de dilution dans le liquide de Ringer-Locke : 0 c. c. 1.

Sauf deux (conjonctive et langue), les animaux ainsi infectés sont morts dans un délai maximum de quatre jours, quelle qu'ait été la voie de l'inoculation (tableau II). Tous ont présenté des lésions œdémateuses, hémorragiques ou nécrotiques, au point où le virus avait été introduit.

(1) Des résultats analogues ont été obtenus ultérieurement sur le lapin par Cernaianu et Suhatzeanu.

TABLEAU II.

LIEU de l'inoculation	DOSES INOCULÉES ET RÉSULTATS OBTENUS					
	0 c. c. 02	0 c. c. 01	0 c. c. 0025	0 c. c. 001	0 c. c. 008	0 c. c. 0005
Conjonctive . . .	+ en 4 j.	+ en 3 j.	+ en 3 j.	+ en 2 j.	Survit.	+ en 3 j.
Langue	+ en 3 j.	+ en 3 j.	+ en 4 j.	+ en 4 j.	+ en 2 j.	Survit.
Derme	+ en 3 j.	+ en 4 j.	+ en 3 j.	+ en 3 j.	+ en 3 j.	+ en 3 j.

Bien qu'elle paraisse légèrement inférieure à celle du derme, la réceptivité des muqueuses ne doit donc pas être tenue pour négligeable dans l'étiologie du charbon. La localisation pharyngée de la maladie chez le porc prouve d'ailleurs que la muqueuse digestive et le tissu cellulaire sous-jacent peuvent être le point de départ et le siège de l'infection. Nous verrons cependant plus loin que si les spores ingérées à doses massives passent directement en petit nombre dans la circulation sanguine, en traversant la muqueuse digestive, il est nécessaire, pour que le charbon éclate, qu'un traumatisme intervienne en libérant dans les tissus réceptifs les germes véhiculés par le sang.

III. — Infection par voie trachéo-pulmonaire.

En dépit des expériences de Buchner, Muskabluth, Wyssokowicz et Enderlen, qui démontraient la possibilité de provoquer chez les animaux une septicémie mortelle en leur faisant inhaler des spores, l'étiologie du charbon pulmonaire, observé chez les ouvriers « trieurs de laine », était restée très obscure. Max, Hildebrandt, Tchitsovitch, Grammatschikoff et Snell avaient même conclu de leurs recherches que le tissu pulmonaire oppose une résistance presque insurmontable à la pénétration directe des bactéries inoculées par voie trachéale. D'une façon plus précise encore, A. Besredka et ses collaborateurs affirmèrent que l'on peut injecter des « doses énormes »

de virus dans la trachée, « sans jamais déterminer le moindre trouble », quand on prend la précaution de ne pas souiller le tégument. C'est ainsi que Brocq-Rousseu et A. Urbain ont constaté que sur 10 cobayes auxquels ils avaient inoculé 0 c. c. 2 de culture charbonneuse très virulente dans la trachée mise à nu, 4 sont restés indemnes. Les 6 autres, qui sont morts de charbon en quatre ou cinq jours, présentaient, au niveau de la plaie opératoire, un œdème caractéristique, vraisemblablement attribuable à une contamination de la peau au moment de l'inoculation. Les cobayes qui avaient survécu n'ont pas résisté, quinze jours plus tard, à l'inoculation sous-cutanée de 0 c. c. 125 de deuxième vaccin charbonneux.

Or, G. Combiesco, bien qu'il eût pris toutes les précautions prescrites par Besredka, réussit à provoquer le charbon chez le cobaye et chez le lapin en leur inoculant 0 c. c. 1 de suspension virulente dans les poumons, par voie transthoracique ou par voie transdiaphragmatique. Les animaux ainsi infectés moururent de septicémie sans avoir présenté la moindre trace d'œdème dans la région inoculée et le développement des bactériidies dans leurs poumons et dans leur plèvre se traduisait par des altérations congestives, hémorragiques et exsudatives.

D'autre part, G. Sanarelli a démontré que l'injection intranasale de 11 gouttes d'une suspension contenant 100.000 spores charbonneuses, au minimum, provoque régulièrement, chez le lapin et chez le cobaye, l'évolution d'une pleuro-pneumonie bactériidienne, qui aboutit rapidement à la septicémie et à la mort.

La technique que nous avons adoptée dans les expériences résumées ci-dessous ne diffère que par quelques détails de celle de G. Sanarelli.

Pour faciliter l'écoulement de la suspension virulente dans la trachée, l'animal est maintenu renversé sur le dos, en position légèrement oblique. On introduit dans une de ses narines l'embout vaseliné d'une seringue de 1 cent. cube, puis, pendant que l'on comprime fortement l'autre narine et les mâchoires, on pousse doucement le piston (1). Quelles que soient les pré-

(1) Nous nous étions assurés, au préalable, qu'une solution de bleu de méthylène injectée au cobaye selon cette technique pénètre d'emblée jusque dans les plus fines ramifications bronchiques.

cautions prises, on ne peut guère éviter qu'une partie du liquide ne soit rejetée par la bouche ou déglutie.

EXPÉRIENCE VIII. — 4 cobayes de 350 à 450 grammes reçoivent par la voie nasale 0 c. c. 5 à 0 c. c. 8 de deuxième vaccin charbonneux.

Tous survivent.

EXPÉRIENCE IX. — 8 cobayes de 150 à 250 grammes reçoivent par la même voie 0 c. c. 5 à 0 c. c. 8 du même virus.

Un meurt le troisième jour et un autre le cinquième jour de charbon septicémique sans œdème superficiel.

On répète la même inoculation dix jours plus tard sur les animaux survivants : aucun ne contracte le charbon.

EXPÉRIENCE X. — 6 cobayes de 200 à 250 grammes reçoivent par la même voie 0 c. c. 5 à 0 c. c. 8 du même virus.

Un meurt le sixième jour, un autre le treizième jour et un troisième le quatorzième jour de charbon septicémique.

Dans l'ensemble, ces expériences confirment celles de G. Sanarelli. Elles prouvent que l'injection d'une suspension virulente par la voie nasale est susceptible, en dehors de toute blessure de la peau et des muqueuses, de provoquer le développement d'un charbon septicémique mortel, avec cette particularité toutefois que la période d'incubation peut être exceptionnellement longue (un cobaye mort charbonneux le treizième jour et un autre le quatorzième jour).

Qu'ils soient tapissés par un épithélium continu, dérivé de l'épithélium bronchique, ou simplement revêtus de cellules mésenchymateuses, disposées en une couche plus ou moins discontinue, mais toujours très mince, comme l'admet Policard, il apparaît ainsi que les alvéoles pulmonaires sont perméables aux bactériidies et que l'infection charbonneuse peut avoir pour point de départ le poumon.

Ce résultat acquis, nous avons étudié le mécanisme suivant lequel les bactériidies, lorsqu'elles sont projetées dans les poumons par la voie trachéale, pénètrent dans la circulation sanguine et contaminent les organes éloignés.

A cette fin, nous avons employé la même technique que dans nos recherches sur la dispersion des bacilles paratuberculeux

dans l'organisme du cobaye et qui consiste à déterminer, par la culture sur des milieux appropriés, le nombre de germes en circulation dans le sang ou fixés dans les viscères prélevés à des intervalles divers après l'inoculation.

EXPÉRIENCE XI. — 13 cobayes reçoivent par la voie nasale 0 c. c. 5 à 0 c. c. 8 de deuxième vaccin charbonneux contenant 500.000 à 800.000 spores. Quinze minutes, soixante-quinze minutes, cinq heures, vingt-quatre heures, deux, trois, quatre, sept et dix jours plus tard, on sacrifie ces animaux par ponction du cœur et on ensemence 6 à 8 cent. cubes de leur sang dans un ballon contenant 50 cent. cubes de bouillon. Puis, après flambage de la peau, des muscles de l'abdomen et du thorax mis à nu, on prélève aseptiquement la rate (en totalité), le foie (un huitième environ), les poumons (le tiers d'un lobe postérieur) et les ganglions trachéo-bronchiques (en totalité), qui sont broyés séparément et mis en suspension dans 5 cent. cubes de solution de Ringer-Locke.

Les suspensions ainsi obtenues sont ensuite ensemencées, à raison de I et X gouttes, sur de la gélose coulée dans des boîtes de Petri ou dans de grands tubes de 22 millimètres de diamètre qu'on laisse à l'étuve pendant trente heures. On vérifie alors, par l'examen microscopique, la pureté des colonies qui se sont développées et on les dénombre. Lorsque les ensemencements n'ont produit aucune culture après ce délai, on reporte les milieux à l'étuve et on les examine de nouveau chaque jour jusqu'au sixième jour (Tableau III).

TABLEAU III.

ORGANES ENSEMENCÉS	INTERVALLES entre les inoculations et les prélèvements (nombre de colonies rapporté à la masse totale des organes prélevés)								
	15 minutes	75 minutes	5 heures	24 heures	2 jours	3 jours	4 jours	7 jours	10 jours
Sang	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Poumons	8	12.000	3.000	6.000	8	0	3.600	0	0
Ganglions trachéo-bronchiques	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rate	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Foie	0	0	0	0	0	0	0	0	0
∞, colonies innombrables.									

Deux cobayes sont morts le quatrième jour et deux autres le septième jour de charbon typique sans œdème superficiel.

EXPÉRIENCE XII. — 15 cobayes reçoivent par la voie nasale 0 c. c. 5 à 0 c. c. 8 d'une culture en bouillon de deuxième vaccin charbonneux âgée de

quarante huit heures. On les saigne ensuite après des délais variés et on ensemence leur sang et leurs organes (Tableau IV) comme dans l'expérience précédente.

TABLEAU IV.

ORGANES ENSEMENCÉS	INTERVALLES entre les inoculations et les prélèvements (nombre de colonies rapporté à la masse totale des organes prélevés)						
	15 minutes	80 minutes	5 h. 1/2	24 heures	2 jours	3 jours	4 jours
Sang	0	0	0	0	0	0	0
Poumons	30.000	360	8	8	0	8	8
Ganglions trachéo-bronchiques .	90	0	72	0	0	160	8
Rate	90	0	0	0	0	0	8
Foie	0	0	0	0	0	0	8

Un cobaye est mort le deuxième jour; 4 le troisième jour; 2 le quatrième jour et 1 le sixième jour de charbon typique, sans œdème superficiel.

Puisque l'ensemencement des poumons des cobayes qui n'ont reçu que des spores charbonneuses (expérience XI), y révèle la présence de ces germes six fois sur sept jusqu'au quatrième jour après l'inoculation, alors que le charbon ne se déclare que dans un petit nombre de cas, on peut en inférer, — sans mettre en doute la possibilité d'une élimination par le mucus bronchique et trachéal, — que les phagocytes alvéolaires sont capables de détruire un certain nombre d'éléments virulents et d'empêcher le développement de l'infection charbonneuse. Les histiocytes pulmonaires se comportent ainsi comme les cellules de Kupffer du foie et les macrophages de la rate dont Werigo a démontré, en 1894, le rôle péxique et lytique dans le charbon du lapin.

Divers expérimentateurs ont d'ailleurs établi que le même phénomène de destruction phagocytaire se produit également dans d'autres tissus. C'est ainsi que la quantité minimum de bactériidies nécessaire pour produire le charbon chez le lapin, varie, selon la virulence des cultures inoculées dans le tissu cellulaire sous-cutané, de 50 germes (Noetzel) à 100 (Chauveau), 6.000 (Pane) et 50.000 (Emmerich). La souris même, dont la

réceptivité au charbon est infiniment plus grande que celle du cobaye et du lapin, résiste parfois, comme nous l'avons montré au début de ce mémoire, à l'inoculation de 0 c. c. 01 de deuxième vaccin dans le tissu dense de l'extrémité de la queue.

Sauf de rares exceptions (cobaye 1 de l'expérience XII par exemple, sacrifié quinze minutes après l'infection), les germes inoculés par la voie nasale ne pénètrent dans la circulation sanguine, en nombre suffisant pour être décelables par la culture du sang et des viscères éloignés, qu'après une période plus ou moins longue, au cours de laquelle quelques-uns d'entre eux sont entraînés dans la lymphe pulmonaire jusque dans les ganglions trachéo-bronchiques où ils sont immobilisés.

Il n'a pas été possible de déterminer si les spores ou les bactériidies filamenteuses franchissent directement la paroi des capillaires, comme le supposait Buchner, ou s'ils n'atteignent le sang que par l'intermédiaire de la lymphe. Cependant, les recherches que nous avons effectuées sur la dissémination des bactériidies inoculées au cobaye, sous la peau de l'extrémité de la patte, nous inclinent à penser que l'absorption par les capillaires sanguins précède et domine l'absorption par les voies lymphatiques. La septicémie vraie, qui succède à la bacillémie, ne se manifeste, en réalité, que dans la période ultime de la maladie. Elle traduit l'extension croissante du foyer pulmonaire et l'infection des viscères abdominaux, en particulier de la rate et du foie. Elle paraît résulter autant, sinon davantage, de l'irruption des bactériidies dans les vaisseaux, que de leur pullulation dans le sang même.

IV. — Infection par voie péritonéale.

En 1898 et 1900, Noetzel et van Leent constataient que la voie péritonéale est moins favorable que la voie cutanée au développement du charbon. Sobernheim et Murata confirmèrent cette notion en démontrant que la dose infectante minimum d'une même culture de bactériidies virulentes est de 1/50.000 pour l'inoculation intrapéritonéale contre 1/1.000.000, c'est-à-dire vingt fois moins, pour l'inoculation intracutanée, sous-cutanée ou intramusculaire.

Les conclusions de Balteano sont beaucoup plus radicales : le péritoine se montrerait totalement réfractaire à l'infection charbonneuse quand on effectue l'inoculation sans contaminer la peau, comme Besredka le recommande expressément. Cependant, cette opinion n'a pas été acceptée sans réserves. Combieco, Cernaianu et Suhatzeanu, Muller, A. Lumière et Montoloy et un grand nombre d'autres auteurs la tiennent même pour inexacte.

On ne pouvait satisfaire aux conditions expérimentales prescrites par Besredka, c'est-à-dire infecter le péritoine en dehors de toute contamination de la peau, sans avoir résolu, au préalable, un petit problème technique essentiel. La méthode de la rupture, dans la cavité péritonéale, de sacs de collodion, d'ampoules ou de tubes capillaires contenant une suspension virulente, comporte une intervention chirurgicale assez délicate. En cas d'insuccès, lorsque, malgré les précautions prises, le charbon éclate, on ne peut avoir la certitude que la plaie opératoire est entièrement cicatrisée et qu'il n'existe pas, dans les plans musculaires suturés, une solution de continuité quelconque permettant la migration de quelques germes de la séreuse au tissu conjonctif sous-cutané et au derme.

L'inoculation au centre d'une plaie abdominale, immédiatement après excision d'un lambeau cutané, employée par Cernaianu et Suhatzeanu n'est pas plus sûre : une gouttelette de virus, comme nous avons pu nous en assurer, peut sourdre à la surface des muscles humectés de lymphe et, en s'étalant, contaminer les bords vifs de la plaie.

Il n'en est plus de même, si l'on intervient vingt-quatre heures au plus tôt après l'excision de la peau. La cicatrisation des tissus mis à nu est alors assez avancée pour que le dépôt d'une goutte de deuxième vaccin sur la surface bourgeonnante, même légèrement excoriée, ne provoque plus le charbon. Lorsque, dans ces conditions, on inocule 0 c. c. 1 de ce vaccin dans la cavité péritonéale, au moyen d'une aiguille très fine implantée au centre de la plaie, 30 à 50 p. 100 des cobayes échappent à l'infection.

Si cette expérience suffit pour démontrer que le péritoine est capable de résister à l'action pathogène de la bactérie charbonneuse, il convenait cependant de la compléter en recher-

chant comment et dans quel délai l'organisme du cobaye parvient à se libérer des germes inoculés.

EXPÉRIENCE XIII. — On excise un lambeau de peau épilée, de 12 à 15 millimètres de diamètre, dans la partie moyenne de la paroi abdominale de 19 cobayes, un peu en dehors et à droite. Badigeonnage à la teinture d'iode.

En même temps, on fait la numération des germes contenus dans le deuxième vaccin charbonneux en l'ensemencant sur des plaques de gélose, après l'avoir dilué à des taux variables : 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 et 1/1.000.000, dans du liquide de Ringer-Locke. On obtient ainsi, en vingt-quatre heures, une moyenne de 1/1.000.000 de colonies par centimètre cube de vaccin pur.

Au moyen d'une fine aiguille à intradermo-tuberculation, implantée au centre de la plaie, on inocule le lendemain, à chacun de ces cobayes, 0 c. c. 1 de deuxième vaccin pur dans le péritoine, en évitant le reflux du liquide virulent à la surface des muscles perforés. Après des délais variés, trente minutes, six heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures, soixante-douze heures, quatre-vingt-seize heures et cent vingt heures, on sacrifie 7 de ces animaux par ponction du cœur et on sème 6 à 8 cent. cubes de leur sang dans 50 cent. cubes de bouillon. On flambe largement la peau, puis la paroi abdominale et le thorax mis à nu et, à travers une petite boutonnière on introduit 5 cent. cubes de solution de Ringer-Locke dans la cavité péritonéale. On masse légèrement l'abdomen avec des pinces stériles et on extrait le liquide injecté. Ce liquide est immédiatement ensemencé, tel quel ou dilué au dixième dans la même solution, sur de la gélose coulée dans des tubes à fond plat (tubes de Legroux), à raison de deux gouttes par tube.

TABLEAU V.

INTERVALLES entre les inoculations et les prélèvements	NOMBRE DE COLONIES rapporté à la masse totale du sang et des organes prélevés					
	Sang	Liquide péritonéal	Épiploon	Rate	Foie	Ganglions mésentériques
30 minutes	0	100	12.500	50	2.400	
6 heures	0	5.000	3.000	∞	800	0
24 heures	0	4.000	2.500	150	2.400	0
48 heures	0	2.000	1.600	500	1.600	0
72 heures A.	+	∞	1.000	∞	∞	∞
72 heures B.	0	0	1.500	0	500	0
96 heures	0	1.500	2.500	500	800	0
120 heures	0	100	5.000	∞	∞	32.000

On prélève aseptiquement l'épiploon (en totalité), la rate (en totalité), un fragment de foie (un douzième environ) et, dans quelques cas, le quart d'un rein ou un ganglion mésentérique. A travers une fenêtre pratiquée dans la

paroi costale, on excise un fragment de poumon (le quart environ d'un lobe postérieur).

Toutes ces opérations sont naturellement effectuées aseptiquement, avec des instruments séparés.

Les organes prélevés sont ensuite découpés en fins morceaux, broyés séparément au mortier avec du sable stérile et mis en suspension dans 5 cent. cubes de solution de Ringer-Locke. Chaque suspension est ensemencée sur deux ou trois tubes de gélose, telle quelle ou diluée au dixième, à raison de deux gouttes par tube. On identifie les colonies qui se sont développées en vingt-quatre heures à 37° et on les dénombre (tableau V).

Des 11 autres cobayes de cette expérience, 4 sont morts de charbon le quatrième jour, 1 le cinquième jour, 1 le sixième jour et 2 le huitième. 3 seulement ont survécu.

EXPÉRIENCE XIV. — 10 cobayes reçoivent par voie péritonéale, comme les précédents, 0 c. c. 1 de deuxième vaccin charbonneux.

TABLEAU VI.

INTERVALLES entre les inoculations et les prélèvements	NOMBRE DE COLONIES rapporté à la masse totale du sang et des organes prélevés				
	Sang	Epiploon	Rate	Foie	Poumons
17 minutes	0		4.000	2.500	50
45 minutes	0	150	150	3.000	Impur.
90 minutes	0	1.000	50	1.500	Impur.
6 heures	0	∞	250	2.500	0
26 heures	+	∞			
48 heures	+	∞	∞	∞	∞
72 heures	0	1.500	500	5.000	0
96 heures	0	250	0	500	

Ce qui frappe tout d'abord à la lecture du tableau V, c'est la rapidité avec laquelle les spores inoculées diminuent dans le liquide péritonéal. Dès la trentième minute, on en retrouve à peine, par la culture, la millième partie; elles deviennent ensuite un peu plus abondantes de la sixième heure à la quatre-vingt-seizième, mais pendant la phase septicémique, les bactériidies pullulent dans l'exsudat comme dans le sang.

Si l'expérience se bornait à cette constatation, on pourrait en inférer que les spores du deuxième vaccin sont, pour la plupart, détruites à bref délai dans la sérosité péritonéale. En réalité,

cette destruction, sur laquelle Basset (1) et, récemment, G. Sanarelli et Alessandrini (2) ont insisté, n'atteint qu'une fraction des germes inoculés; les autres trouvent refuge dans l'épiploon, la rate, le foie, les reins et, un peu plus tard, dans les poumons.

La présence de spores en assez grand nombre dans l'épiploon s'explique aisément en raison de la souillure directe de cet organe par la suspension virulente et du « balayage » qu'il effectue à la surface des organes digestifs. Il s'agit là, comme on sait, d'un processus banal, qui se manifeste presque invariablement chaque fois que l'on introduit dans le péritoine des microbes, pathogènes ou non, vivants ou morts, voire des substances pulvérulentes inertes.

Étant donnés les résultats négatifs des hémocultures, il est difficile de préciser comment s'opère l'invasion de la rate et du foie. Cependant la stérilité du mésentère et des ganglions mésentériques semble indiquer que les bactériidies se trouvent non pas à la surface des organes précités, mais dans leur profondeur.

EXPÉRIENCE XV. — Dans un autre essai, 17 cobayes reçurent également, dans le péritoine, à travers une fenêtre pratiquée la veille, o. c. c. 1 de deuxième vaccin.

3 de ces cobayes ont été sacrifiés un, deux et trois jours après l'inoculation. La recherche des bactériidies dans la plaie abdominale n'a permis de retrouver que quelques rares éléments. L'hémoculture a été négative.

3 autres sont morts le cinquième jour dont 2 avec œdème de la paroi abdominale; 1 le sixième jour, sans œdème; 1 le huitième jour, sans œdème; 1 le dixième jour, sans œdème et 1 le treizième jour, sans œdème. 7 ont survécu.

Enfin, pour vérifier si une réaction leucocytaire préexistante

(1) Basset a constaté que la sérosité péritonéale ne contient plus que de rares bactériidies trente heures après l'inoculation de 1 cent. cube de culture virulente. A ce moment, on trouve dans les frottis d'épiploon quelques éléments « qui ne gardent plus le Gram ou le gardent irrégulièrement et sont manifestement en voie de dissolution ».

(2) Pour G. Sanarelli et Alessandrini, la lymphe péritonéale du lapin jouit de propriétés antimicrobiennes telles que, moins de cinq heures après l'inoculation de doses énormes de bactériidies virulentes, — jusqu'à deux cultures jeunes sur gélose — elle redevient complètement stérile.

peut favoriser ou entraver la végétation des spores et modifier les résultats de l'inoculation intrapéritonéale, nous avons fait l'expérience qui suit.

EXPÉRIENCE XVI. — On excise un lambeau de peau de la région abdominale sur 18 cobayes répartis en trois lots. Dix-huit heures après, 6 de ces animaux reçoivent dans le péritoine, à travers une fenêtre cutanée, 5 cent. cubes de solution de Ringer-Locke et 6 autres 5 cent. cubes de bouillon : six heures plus tard, les cobayes des trois lots sont infectés par inoculation intrapéritonéale de 0 c. c. 1 de deuxième vaccin, également pratiquée au centre de la fenêtre cutanée.

3 cobayes du premier lot (Ringer-Locke) sont morts charbonneux les sixième, septième et huitième jours, dont un avec œdème sous-cutané.

3 cobayes du deuxième lot (bouillon) sont morts charbonneux le cinquième jour sans œdème sous-cutané.

3 cobayes du troisième lot (témoins) sont morts charbonneux dont un avec œdème sous-cutané.

Même si l'on tient compte des inoculations manquées, c'est-à-dire de la projection du liquide virulent dans une anse intestinale perforée par l'aiguille (1), les résultats de toutes ces expériences concourent à démontrer que le péritoine du cobaye offre une grande résistance à l'infection bactérienne et que cette résistance ne dépend pas, au premier chef, de l'intervention des leucocytes émigrés à la surface de la séreuse.

Les spores inoculées sont graduellement inactivées en partie par la sérosité péritonéale, en partie par les cellules phagocytaires de l'épiploon, de la rate et du foie. Mais leur destruction est souvent incomplète, et le charbon éclate dans la moitié des cas.

Toutes précautions ayant été prises pour éviter la contamination de la peau, il semble ainsi — réserves faites sur la possibilité d'une souillure des muscles et du tissu conjonctif traversés par l'aiguille — que l'infection ait alors pour point de départ les organes abdominaux. Qu'il s'agisse dans cette circonstance d'une plus grande virulence de certains germes ou de leur encapsulation plus rapide, ou encore d'une insuffisance des

(1) M. Nicolle estimait que cette cause d'erreur peut fausser jusqu'à 10 p. 100 des résultats des inoculations intrapéritonéales les plus « canoniques ».

facteurs bactériolytiques, cellulaires ou humoraux, on peut donc supposer que, après une période d'incubation plus ou moins longue, il se produit sur place une abondante pullulation secondaire des bactéries, comparable à celle que Werigo a observée chez les lapins inoculés par voie veineuse.

Quoi qu'il en soit, la résistance du péritoine n'est pas particulière à l'infection charbonneuse : la microbiologie expérimentale en contient des exemples non moins significatifs. Si intéressant qu'apparaisse ce phénomène, nous ne pensons pas qu'il puisse être invoqué en faveur de la réceptivité exclusive du tégument, ni servir de base à une nouvelle théorie pathogénique du charbon.

V. — Infection par les voies digestives.

Avant que la vaccination pasteurienne ait permis de faire disparaître les « champs maudits », et de protéger les animaux contre les atteintes de la bactérie, le charbon sévissait sur les bovidés et sur les ovins comme la plus tenace et la plus redoutable des épizooties. Des troupeaux d'une valeur considérable étaient décimés en quelques jours ou en quelques semaines, de vastes régions étaient soustraites à l'élevage, et la source du contagement semblait inaccessible ou intarissable.

Ce caractère épizootique de l'infection charbonneuse, l'allure de sa diffusion, son intensité, la brutalité avec laquelle elle se déchaînait périodiquement paraissaient démontrer, de la façon la plus évidente, que les germes spécifiques sont abondamment répandus sur le sol des pâtures ou dans les eaux et qu'ils pénètrent dans l'organisme avec les aliments ou les boissons.

Le siège des lésions dans les organes digestifs ou dans leur voisinage (œdème de la gorge) et les altérations des ganglions sous-maxillaires, pharyngés ou mésentériques, qui caractérisent le charbon, dénonçaient également son origine alimentaire. Par ailleurs, les résultats heureux d'une prophylaxie fondée sur la migration des troupeaux contaminés et l'interdiction des pâturages suspects justifiaient, en apparence, cette hypothèse. On sait qu'elle fut adoptée et vérifiée expérimentalement par Pasteur, Chamberland et Roux, puis par R. Koch.

Gaffky et Loeffler et qu'elle reçut l'adhésion de tous les pathologistes, sauf quelques réserves portant sur le segment de l'appareil digestif au niveau duquel la pénétration des bactériidies pouvait s'effectuer.

Or, en posant en principe que « la réceptivité du cobaye et du lapin » et, par analogie, celle des autres espèces animales, « réside principalement, sinon entièrement » dans leur « appareil cutané », Besredka remit en question le problème étiologique du charbon. Mais la contradiction était si flagrante entre l'interprétation que proposait cet auteur et la conception pasteurienne, qu'il était nécessaire d'en chercher l'explication. C'est ainsi que l'un de nous fut conduit à reprendre sur le cobaye l'étude de la perméabilité de la muqueuse digestive à la bactériдие charbonneuse et, éventuellement, celle de l'infection *per os*.

Si l'on fait ingérer à des cobayes, à jeun depuis trente-six heures, une grande quantité de spores et de bactéries du deuxième vaccin charbonneux — le contenu d'une boîte de Roux pour 3 cobayes — mises en suspension dans quelques centimètres cubes de liquide de Ringer-Locke, et répandues sur de la mie de pain, on constate que l'ensemencement en bouillon de 6 à 8 cent. cubes du sang de ces animaux, prélevé quelques heures après, fournit 6 fois sur 10 une culture pure de bactériidies. La présence de ces microbes dans la circulation sanguine peut ainsi être décelée entre la deuxième et la huitième heure après le repas infectant. Au delà, les hémocultures restent stériles, sauf dans le cas de septicémie secondaire dont il sera question plus loin.

Bien que quelques germes aient pénétrés dans leur circulation sanguine, les cobayes qui résistent à l'ingestion de doses massives de virus charbonneux ne manifestent dans la suite aucune immunité spécifique : éprouvés trois semaines plus tard par inoculation sous-cutanée de 0 c. c. 1 de deuxième vaccin, ils contractent invariablement le charbon. Ces animaux se comportent ainsi comme ceux de Besredka, qui restent indemnes après l'inoculation intraveineuse de bactériidies, effectuée sans souillure de la peau, et conservent toute leur réceptivité à l'infection charbonneuse.

Etant donné qu'un seul animal sur six, en moyenne, infectés

per os, mais *non saignés*, meurt de charbon du quatrième au neuvième jour, en présentant, le plus souvent, un volumineux œdème de la gorge, il semblait résulter de cette expérience que le cobaye, comme l'avaient déjà constaté Pasteur, Chamberland et Roux, manifeste une très grande résistance à l'infection charbonneuse par les voies digestives.

Mais le fait suivant nous a particulièrement frappés. Tous les cobayes, que nous avons saignés par ponction du cœur, deux à vingt heures après le repas infectant, sont morts de charbon. Chez la plupart d'entre eux, l'autopsie permit de constater la présence d'un œdème caractéristique du tissu cellulaire sous-cutané, autour du point de pénétration de l'aiguille, dans la région inférieure de la poitrine. Par contre, les animaux infectés de la même manière, mais non saignés, sont presque tous restés indemnes.

Même en tenant compte de la possibilité d'une souillure de dehors en dedans au moment de la saignée, ou peu de temps après, de la peau traversée par l'aiguille, l'idée s'imposait que le charbon observé chez les cobayes dont on avait prélevé le sang était d'origine endogène, et qu'il résultait d'une contamination de la blessure par le sang bacillifère épanché dans les tissus traumatisés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait alors l'expérience que voici :

EXPÉRIENCE XVII. — 21 cobayes à jeun ingèrent chacun, comme ceux de l'expérience précédente, le tiers d'une culture sporulée de deuxième vaccin charbonneux sur boîte de Roux. 4 sont saignés par ponction cardiaque et leur sang (8 cent. cubes environ) estensemencé dans 50 cent. cubes de bouillon, l'un trois heures, l'autre quatre heures, le troisième cinq heures et le quatrième vingt heures après le repas infectant.

L'hémoculture fut positive pour le second cobaye et le troisième, négative pour les deux autres. Tous moururent de charbon.

Six cobayes du même lot, dont la peau avait été largement épilée (flanc et région costale), rasée, scarifiée ou fortement contusionnée par écrasement, entre la quatrième et la vingtième heure après l'infection, devinrent également charbonneux. Deux autres, qui avaient reçu sous la peau, dans le même délai, 2 cent. cubes de liquide de Ringer-Loke moururent de charbon entre le quatrième et le sixième jour.

Sur 9 cobayes du même lot, qui n'avaient été soumis à aucun traumatisme, 8 restèrent indemnes.

Enfin, des 7 cobayes témoins, traumatisés comme les précédents et laissés à leur contact, pour contrôler l'éventualité d'une infection d'origine externe par la litière souillée, aucun n'a été contaminé.

Hruska a répété cette expérience sur des chevreaux auxquels il fit absorber, soit au moyen d'un biberon, soit au moyen d'une sonde, soit en lavement, une suspension de spores et de bactériidies virulentes (le contenu d'une boîte de Petri par animal). Dans chaque lot on garda la moitié des animaux comme témoins ; les autres furent blessés au moyen d'un scalpel dans la région cervicale, puis saignés quatre à huit heures après l'infection. Les résultats ont été les suivants :

Premier lot (*animaux infectés par voie buccale*) ; l'hémoculture fut positive dans un cas quatre heures après l'infection et négative dans les autres. On constata le développement d'un œdème hémorragique au niveau du traumatisme chez l'animal dont l'hémoculture avait été positive. Les trois témoins sont restés indemnes.

Deuxième lot (*animaux infectés au moyen d'une sonde*). Hémo-cultures négatives. Aucun cas de charbon.

Troisième lot (*animaux infectés par voie rectale*). Hémo-culture positive dans un cas ; l'animal a succombé au charbon avec œdème au point de ponction ; hémoculture négative dans un autre cas, cependant l'animal est mort charbonneux comme le précédent, avec œdème au point de ponction. Hémo-cultures négatives et absence de charbon dans deux autres cas.

Sans contester que les bactériidies administrées *per os* soient capables de provoquer un charbon mortel, G. Sanarelli pense que les spores ingérées avec les aliments ou régurgitées, peuvent être aspirées et entraînées dans l'arbre respiratoire. Il a réussi à les mettre en évidence dans les poumons quelques heures après le repas infectant et, vingt-quatre heures plus tard, dans d'autres viscères, en particulier dans la rate où elles resteraient en condition de vie latente et ne parviendraient pas à végéter. Mais elles sont « mises en état de germer, de se développer et de déclencher l'infection générale ou charbon dit interne » quand on injecte dans la rate, le foie, les reins, les

parois de l'intestin, dans le tissu conjonctif sous-cutané ou la circulation sanguine, des substances telles que l'arsenic, l'acide lactique, la quinine, etc. « capables de créer des foyers nécrobiotiques ou nécrotiques, ou même de troubler de quelque façon la concentration moléculaire des éléments cellulaires ou les rapports physico-chimiques de leurs colloïdes, en détruisant la symbiose provisoire somato-parasitaire ».

Nous nous croyons cependant autorisés à conclure de nos expériences que les spores charbonneuses, lorsqu'elle sont administrées *per os*, à doses massives, sont capables de traverser la muqueuse digestive et de pénétrer dans la circulation sanguine. A l'appui de cette opinion, les recherches que nous avons effectuées sur la perméabilité des divers segments de l'appareil digestif au bacille paratuberculeux de la fléole, ont démontré que ces germes saprophytes sont absorbés au niveau de la région pharyngo-amygdalienne et qu'ils passent dans le sang, même quand toute communication avec les poumons a été supprimée par section de la trachée.

Les spores charbonneuses qui, par un mécanisme analogue, pénètrent dans le système circulatoire, s'y trouvent en assez grand nombre pour être décelables par l'ensemencement de la sixième partie environ du sang total quelques heures après le repas virulent. Mais cette bacillémie transitoire ne s'accompagne pas nécessairement du développement de l'infection charbonneuse. Sauf dans quelques circonstances accidentelles, liées à une contamination massive des amygdales et du pharynx et, vraisemblablement, à la présence d'érosions sur la muqueuse de cette région, le charbon ne se déclare pas en raison de ce fait que les germes véhiculés par le sang sont rapidement captés, englobés et détruits par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial. Ce bref séjour des spores charbonneuses dans le sang et dans les tissus, les réactions cellulaires qu'elles mettent en jeu et la libération de leurs substances antigènes qui en résulte ne laissent d'ailleurs aucune trace dans l'organisme et ne lui confèrent pas le moindre signe d'immunité.

Par contre, l'infection risque de se produire si, pendant les quelques heures que le sang contient des éléments virulents, la peau et les tissus sous-jacents sont lésés d'une façon quel-

conque. Les germes déversés par les vaisseaux rompus ou altérés peuvent alors se multiplier sur place avec la même facilité que s'ils avaient été inoculés directement dans le derme.

Conclusions.

Le charbon se caractérise moins par le développement d'un foyer exsudatif, hémorragique ou nécrotique au siège même de l'inoculation, que par l'infection générale de l'organisme due à une bacillémie progressive. Sa gravité dépend à la fois de la rapidité avec laquelle les bactériidies prolifèrent dans ce foyer initial et de la précocité ou de l'intensité de leur dispersion par les voies lymphatiques et sanguines.

Contrairement à l'opinion émise par Besredka, la peau ne jouit pas d'une sensibilité exclusive à l'égard du charbon. Si le derme cutané ou muqueux se prête, mieux que les autres tissus à la végétation des bactériidies, les réactions cellulaires dont il est le siège peuvent cependant, dans certains cas, ralentir ou entraver leur dissémination : la maladie se traduit alors par une toxémie plus ou moins profonde et par une lésion locale plus ou moins étendue, qui guérit parfois spontanément.

Chez le cobaye, le tissu conjonctif sous-cutané et sous-muqueux se montre également réceptif à l'infection charbonneuse. Mesurée par la dose minimum mortelle de deuxième vaccin, la réceptivité du tissu cellulaire sous-cutané est environ quatre à cinq fois plus faible que celle du derme. Sans méconnaître l'influence du milieu humoral local sur la végétation des bactériidies, on peut en inférer que les éléments cellulaires — leucocytes émigrés et histiocytes — qu'elles mettent en jeu dans ce tissu interviennent d'une façon plus active et plus efficace dans leur fixation et dans leur destruction.

Les bactériidies inoculées par voie nasale sont susceptibles d'atteindre les alvéoles pulmonaires, de franchir leurs parois et de provoquer une septicémie mortelle qui a pour point de départ le tissu pulmonaire contaminé. Il en résulte que le charbon des « chiffonniers » et des « trieurs de laine » peut être considéré comme une infection aérogène, conformément aux observations cliniques et aux résultats des expériences d'inhalation.

Les spores du deuxième vaccin inoculées dans la cavité péritonéale du cobaye sont partiellement détruites dans la sérosité et dans l'épiploon, la rate et le foie où elles pénètrent à bref délai : l'infection par cette voie avorte dans un grand nombre de cas. Lorsqu'elle survient, il semble qu'elle soit due non pas à une contamination accidentelle de la peau, mais à la pullulation des germes dans ces organes mêmes.

La muqueuse digestive saine se montre peu perméable aux spores charbonneuses. Néanmoins, quelques-unes d'entre elles passent dans la circulation sanguine où on les retrouve par l'hémoculture deux à huit heures après l'administration de doses massives *per os*. Mais elles sont rapidement fixées et détruites par les cellules phagocytaires du foie, de la rate et de la moelle osseuse et l'infection ne se déclare pas. Pour qu'elle risque de se produire — réserves faites pour le charbon de la gorge qui résulte de l'absorption de spores au niveau des amygdales et du pharynx, — il est nécessaire que les bactériidies véhiculées par le sang soient déversées, à la faveur d'un traumatisme, en un point quelconque de la peau ou du tissu cellulaire sous-cutané. On peut supposer que le charbon dit interne des grands animaux relève d'un mécanisme analogue.

BIBLIOGRAPHIE

- AÏTOFF (M.), Inoculation du charbon par la muqueuse conjonctivale. Ces *Annales*, **36**, 1922, p. 567.
- BALTEANO (J.), L'infection charbonneuse et l'immunité anticharbonneuse chez les lapins et les cobayes. Ces *Annales*, **36**, 1922, p. 805.
- BALTEANO (J.), Sur la cuti-infection charbonneuse chez le lapin et le cobaye. *C. R. Soc. de Biol.*, **87**, 1922, p. 652.
- BASSET (J.), Réceptivité du péritoine et du sang pour *B. anthracis*. *C. R. Soc. de Biol.*, **93**, 1923, p. 413.
- BESREBKA (A.), Vaccination par voie cutanée. Charbon. Cuti-infection, cuti-vaccination, cuti-immunité. Ces *Annales*, **35**, 1921, p. 421.
- BESREBKA (A.), Immunité générale par immunisation locale. *Bull. Inst. Pasteur*, **20**, 1922, pp. 473 et 513.
- BESREBKA (A.), Rôle de la peau dans l'immunité naturelle au cours des infections et dans l'immunité acquise. *Bull. Inst. Pasteur*, **23**, 1925, p. 873.
- BESREBKA (A.), *Immunité locale*. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1925.
- BOQUET (A.), Rôle des traumatismes dans l'infection charbonneuse du cobaye par les voies digestives. *C. R. Acad. des Sciences*, **178**, 1924, p. 260.
- BOQUET (A.), Sur l'infection charbonneuse du cobaye par inoculation sous-muqueuse de bactériidies. *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, 1924, p. 72.

- BOQUET (A.), Sur la réceptivité du cobaye et de la souris au charbon. *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, 1924, p. 911.
- BOQUET (A.), Sur le mécanisme de l'infection charbonneuse. *C. R. Soc. de Biol.*, **99**, 1928, p. 1772.
- BOQUET (A.) et SAENZ (A.), Essai de vaccination de la souris blanche contre l'infection charbonneuse. *C. R. Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 578.
- BOQUET (A.) et SAENZ (A.), Sur l'infection charbonneuse du cobaye par inoculation intranasale. *C. R. Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 765.
- BOQUET (A.) et SAENZ (A.), Sur le mécanisme de l'infection charbonneuse d'origine pulmonaire. *C. R. Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 768.
- BROCC-ROUSSEU et URBAIN (A.), De la réceptivité pulmonaire à l'infection charbonneuse chez le lapin et le cobaye. *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, 1924, p. 4.
- BRUSAPERRO, Il virus carbonchioso deposto nel sacco congiuntiva determina l'infezione? *Il. mod. Zoiatro*, 1901, p. 6.
- CERNIANU (C.) et SUHATZEAZU (S.), Sur la réceptivité des divers tissus pour le charbon expérimental. *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, 1924, p. 869.
- COMBIESCO (D.), Recherches sur le mécanisme de l'infection charbonneuse. *C. R. Soc. de Biol.*, **89**, 1923, p. 639.
- COMBIESCO (D.), Sur la réceptivité pulmonaire au charbon. *C. R. Soc. de Biol.*, **90**, 1924, p. 752.
- COMBIESCO (D.), Recherches expérimentales sur l'infection charbonneuse et l'immunité anticharbonneuse. *Arch. Roum. Path.*, **1**, 1928, p. 81.
- HRSKA (C.), Rôle du traumatisme lors de l'infection charbonneuse du chevreau par la voie digestive. *C. R. Acad. des Sciences*, **186**, 1928, p. 1868.
- VAN LEENT, Über das verhalten des *B. anthracis* in der peritonealhöhle des Meerschweinchens. *Zent. f. Bakt.*, **28**, 1900, p. 737.
- LUMIÈRE (A.) et MANTOLOY (M^{re}), Infection et immunité charbonneuse par voie péritonéale. *C. R. Acad. des Sciences*, **182**, 1926, p. 594.
- MÜLLER (L.), Quelques recherches sur le mécanisme de l'infection charbonneuse. *C. R. Soc. de Biol.*, **95**, 1926, p. 861.
- NOETZEL, Über die bakterienresorption frischer Wunden. *Deut. med. Woch.*, 1898, p. 65.
- NOETZEL, Über funktionelle resorption und infection. *Ibid.*, p. 66 et *Arch. Klin. Chir.* **57**, 1898, p. 311.
- PLOTZ (H.), Rôle de la peau dans l'infection et l'immunité charbonneuse. *Ces Annales*, **38**, 1924, p. 169.
- RIVALIER (E.), *Recherches expérimentales sur l'infection et l'immunité par la voie culanée*. Arnette, édit., Paris, 1928.
- RÖMER (P.), Recherches expérimentales sur les infections à point de départ conjonctival. *Zeits. f. Hyg.*, **32**, 1899, p. 295.
- SANARELLI (G.), Sur la pathogénie du charbon dit interne ou spontané. *Ces Annales*, **39**, 1925, p. 209 (Bibliographie très complète des travaux sur l'infection charbonneuse par les voies respiratoire et digestive).
- SANARELLI (G.) et ALESSANDRINI, Atténuation graduée, permanente et héréditaire de la bactériémie charbonneuse par la lymphe péritonéale du lapin. *C. R. Soc. de Biol.*, **111**, 1932, p. 849.
- SOBERNHEIM et MURATA, Vergleichende untersuchungen über die bedeutung des Infektionsmodus bei der experimentellen Milzbrandinfektion. *Zeitsch. f. Hyg.*, **103**, 1924, p. 691.
- WERIGO, Développement du charbon chez le lapin, d'après les tableaux microscopiques du foie et de la rate. *Ces Annales*, **8**, 1894, p. 1.

LA PROPHYLAXIE ANTIDIPHTÉRIQUE
PAR LA VACCINATION AU MOYEN DE L'ANATOXINE
DANS UNE VILLE DE LA BANLIEUE PARISIENNE
(BOULOGNE-SUR-SEINE)

par SUZANNE DREYFUS.

Dans une note récemment présentée à l'Académie de Médecine, en collaboration avec M. Besançon, nous avons fourni une statistique des cas de diphtérie enregistrés dans la ville de Boulogne-sur-Seine pendant les années 1928, 1929, 1930 et 1931.

Nous avons fait connaître, en outre, les moyens employés par le Bureau d'Hygiène de cette localité pour vulgariser la vaccination antidiphtérique par la méthode de Ramon, lesquels furent couronnés de succès, puisque sur une population de 5.000 enfants environ fréquentant les écoles et les crèches, 3.837 en 1931 avaient reçu trois injections d'anatoxine, c'est-à-dire 35 unités.

Des tableaux que nous allons exposer plus loin, deux sont particulièrement démonstratifs, ceux des années 1930 et 1931. En effet, nous avons pu recenser, d'une part les cas de diphtéries déclarés chez les enfants non vaccinés, et d'autre part les cas de diphtérie déclarés à la mairie.

On peut s'étonner à première vue que le nombre des cas de diphtérie n'ait guère varié au cours des années 1928, 1929, 1930, 1931, malgré la vaccination, puisque en 1928 on en relève 106 cas; en 1929, 76 cas; en 1930, 99 cas; en 1931, 57 cas; mais le nombre global de cas ne dépend pas de la vaccination, il dépend de l'intensité de l'épidémie de diphtérie. Il est bien certain que cette intensité varie d'une année à l'autre. Ce qu'il faut donc considérer, c'est la proportion des cas de diphtérie chez les enfants vaccinés et chez ceux qui ne l'ont pas été.

Or, en 1930, sur 99 cas de diphtérie, il y en a 80 sur

1.855 enfants non vaccinés, et 19 sur 3.145 enfants vaccinés.

En 1931, sur 57 cas de diphtérie, il y en a 50 sur 4.463 enfants non vaccinés, et 7 sur 3.837 enfants vaccinés.

Tous les examens de gorge ont été contrôlés bactériologiquement par nous, que les enfants aient été soignés dans leur famille ou dans le service du Dr Huber à l'hôpital Ambroise-Paré de Boulogne-sur-Seine.

Sur les 19 cas de l'année 1930 survenus chez les enfants vaccinés, 6 furent bénins à tel point que les enfants ont été gardés chez leurs parents, et qu'ils guérissent sans sérum après désinfection de la gorge par des badigeonnages de novarsénobenzol, de tripaflavine, ou de bleu de méthylène.

Sur les 7 cas de diphtérie de 1931 chez les enfants vaccinés, 1 enfant a été soigné à domicile et n'a pas reçu de sérum. Il a parfaitement guéri.

En 1930, il n'y a pas eu un seul décès parmi les enfants vaccinés, et en 1931 nous avons eu 1 décès à l'hôpital, mais l'enfant avait été vacciné à la campagne, et nous n'avons pas pu contrôler dans quelles conditions et avec quelle rigueur cette vaccination avait été pratiquée.

Sauf pour ce cas, toutes les vaccinations ont été faites soit par les soins de la Préfecture de la Seine avec l'aide des médecins inspecteurs et les assistantes scolaires, soit dans les crèches par les médecins des crèches, soit à la consultation externe de service Panot de l'hôpital Ambroise-Paré.

Les statistiques que nous publions ici ne portent que sur les cas de diphtérie constatés chez des enfants de un à douze ans, et déclarés à la mairie de Boulogne-sur-Seine, et dans ces statistiques nous ne tenons compte que des vaccinations dont la rigueur a pu être contrôlée, exception faite pour le cas noté plus haut.

Ces vaccinations sont pratiquées en trois injections à trois semaines d'intervalle au début, et depuis 1930 cet intervalle a été réduit à deux semaines aux doses de 1 cent. cube, 1 cent. cube 5 et 2 cent. cubes, soit 45 unités antitoxiques.

Une autre série de recherches a montré l'influence en faveur de la vaccination antidiphtérique. C'est le dépistage des porteurs de germes.

Tous les enfants admis dans les crèches subissent à leur

entrée un ensemencement du nez et de la gorge, qu'ils aient été vaccinés ou non. Si parmi eux se trouve un porteur de germes, il est isolé jusqu'à ce qu'il ait eu au moins deux ensemencements négatifs, et soumis pendant son isolement à une désinfection du nez et de la gorge.

De même chaque enfant qui doit partir soit en préventorium, soit en colonie de vacances, subit avant son départ un ensemencement du nez et de la gorge. Si ce dernier est positif, l'enfant subit une désinfection du nez et de la gorge et ne part que lorsqu'il a eu deux examens négatifs.

Enfin, si un cas de diphtérie se déclare dans une classe, on fait à tous les enfants de la classe un ensemencement du nez et de la gorge. Ceux qui ont des prélèvements positifs sont rendus à leur famille avec prescription de désinfection naso-pharyngée et ne sont admis à réintégrer la classe qu'après avoir eu un examen négatif.

Ces mesures ont donné les résultats suivants :

En 1929, nous avons examiné 522 ensemencements de nez et de gorge, 167 furent positifs, soit 31,99 p. 100.

En 1930, nous en avons examiné 473, dont 206 furent positifs, soit 43,65 p. 100.

Enfin, en 1931 nous en avons examiné 291, dont 108 furent positifs, soit 37,11 p. 100.

Ce qui est frappant d'après ces résultats, c'est la proportion élevée des cas positifs, puisqu'elle varie de 32 à 44 p. 100. Si donc on prescrit les mesures que nécessitent ces constatations, il faut que presque la moitié de la population scolaire ou pré-scolaire soit tenue en quarantaine, ce qui est d'une réalisation très compliquée. De plus, les enfants des écoles qui côtoient à chaque instant les gens de l'extérieur, peuvent à tous moments devenir porteurs de germes, et par suite représentent une source de contamination.

D'après ces chiffres, nous constatons que les proportions des ensemencements positifs n'ont guère varié de façon appréciable ; ce qui est intéressant à noter cependant, c'est la diminution du nombre de prélèvements examinés avec les progrès de la vaccination antidiphtérique.

On éviterait peut-être encore un certain nombre de cas de diphtérie s'il était possible de faire à tous les porteurs de

germes une épreuve de Schick, et dans les cas de réaction positive de vacciner ceux qui ne l'ont pas été, ou de faire une quatrième injection d'anatoxine à ceux qui n'en auraient reçu que trois.

Considérant les essais de vaccination antidiphtérique en série, faits soit à l'étranger, soit en France, nous voyons que les résultats concordent avec ceux que nous venons d'exposer. Si la diphtérie ne peut disparaître complètement des milieux vaccinés, sa morbidité a, en tous cas, considérablement diminué.

CONCLUSIONS.

Il résulte, de ces recherches, que si le dépistage des porteurs de germes est un adjuvant à la vaccination, comme moyen prophylactique contre la diphtérie, son importance est relativement faible, et c'est surtout par une vaccination intensive que l'on pourra lutter contre la diphtérie.

Nous avons vu que cette vaccination en série est facilement réalisable, puisque dans une agglomération d'enfants nous avons pu obtenir une proportion de 75 p. 100 d'enfants vaccinés par l'anatoxine de Ramon.

		ENFANTS non vaccinés	ENFANTS vaccinés
1928	{ Nombre.	4.532	380
	{ Cas totaux	106	
	{ Décès.	7	
	{ Cas pour 1.000 enfants	21,20	
1929	{ Nombre.	2.509	2.491
	{ Cas totaux	76	
	{ Décès.	2	
	{ Cas pour 1.000 enfants	15,20	
1930	{ Nombre.	1.855	3.145
	{ Cas.	80	19
	{ Décès.	1	0
	{ Cas pour 1.000 enfants	43,12	6,04
1931	{ Nombre.	1.163	3.837
	{ Cas.	50	7
	{ Décès.	1	1
	{ Cas pour 1.000 enfants	42,97	1,82

BIBLIOGRAPHIE

- G. RAMON. *C. R. Académie des Sciences*, 177, 1923.
- G. F. et G. H. DICK. *The Journal of Amer. Med. Assoc.*, vol. XCII.
- A. SCHWARTZ et F. R. JANNEY. *Amer. Journal of Diseases of Children*, vol. XXXIX, 1930 ; *The Journal of the Amer. Med. Assoc.*, vol. XCIV, 1930.
- WEINFELD et COOPERSTOCK. *The Journal of the Amer. Med. Assoc.*, vol. XXXVIII, 1929.
- S. THOMPSON. *The Journal of the Indiana state Med. Assoc.*, vol. XXXII, 1929.
- SILVERMANN. *Amer. Journal of Diseases of Children*, vol. XXXVII, 1929.
- W. T. HARRISON. *Public Health Reports*, vol. XLV, n° 33, 1930.
- SELIGMANN. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, vol. L, n° 27, 1929.
- FITZ GERALD. *Medical Bulletin University of Toronto*, vol. X, n° 2, 1930.
- ADAMS. *The Public Health Journal*, février 1928.
- ZDRODOWSKI et HALIAPINE. *Ces Annales*, vol. XLII, 1928.
- LEREBOULET et GOURNAY. *Société de Pédiatrie*, 19 novembre 1929.
- Rapport du Dr TERRIER. *Société de Pédiatrie*, 18 mars 1930.
- DEICHER-JAHRESK. *F. ärztel Fortbild H*, 10 octobre 1928.
- W. PARK. *The Journal of the American Medical Assoc.*, vol. LXXIX, 1922.
- HENRI SCHVERS. *La Presse Médicale*, n° 39, 1930.
- G. PARA. *Bull. Acad. de Méd.*, vol. CII, 1929.
- L. MARTIN, G. LOISEAU et LAFAILLE. *Bull. Acad. de Méd.*, vol. CII, 1929.
- M. et G. MOZER. *Bull. et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux*, XLII, n° 38 ; t. XLIV, n° 28, 1928 ; *La Presse Médicale*, n° 93, 1929.
- G. RAMON. *Ces Annales*, t. XLV, septembre 1930.
- G. RAMON et R. DEBRÉ. *La Presse Médicale*, nos 29 et 32 des 6 et 20 avril 1932.
- DOPTER. *Bull. Acad. de Méd.*, t. CVII, n° 21, 1932.
- H. POULAIN. *Acad. de Méd.*, juin 1932.

RECHERCHES SUR L'IMPORTANCE DES SULFATES COMME ENGRAIS

par GABRIEL BERTRAND et L. SILBERSTEIN.

Le soufre entre dans la constitution des matières protéiques dont se compose, en partie, le contenu cellulaire. Aussi ne peut-on obtenir de bonnes récoltes dans les expériences de laboratoire en milieux artificiels, sans introduire dans ces milieux une certaine proportion de soufre combiné sous une forme assimilable, par exemple celle de sulfate alcalin ou de sulfate calcique. Mais en est-il de même dans la pratique agricole? Les agronomes auxquels on pose la question répondent qu'ils ne se préoccupent pas de fournir des engrais sulfatés aux plantes et ils pensent même en général que cela est tout à fait inutile. L'un de nous a expliqué comment une telle manière de voir avait pu prendre naissance et montré le danger qu'elle ne manquerait pas de faire courir à la culture et, en particulier, à la culture intensive (1).

Depuis, l'argumentation s'est précisée. Les recherches que nous avons poursuivies, à l'aide d'une méthode d'analyse chimique plus rigoureuse que celles utilisées jusque-là (2), nous ont permis d'établir que, non seulement les plantes exigent pour la construction de leurs tissus des quantités de soufre plus grandes qu'on le supposait (3), mais que les terres cultivées peuvent ne contenir que des proportions très petites de soufre assimilable, parfois même inférieures à quelques décigrammes par kilogramme (4).

Il était logique d'admettre, une fois ces faits établis, que du soufre ajouté sous forme de sulfate soluble à une terre pauvre

(1) Gab. BERTRAND. *C. R. Ac. Agr.*, **13**, 1927 p. 117 et 146; *Bull. agricole*, **47**, 1927, p. 19 et *C. R. IX^e Congr. de Chimie industrielle*, 13-19 octobre 1929.

(2) Gab. BERTRAND et L. SILBERSTEIN. *Bull. Soc. chim.* (4), **41**, 1927, p. 950.

(3) *C. R.*, **189**, 1929, p. 886 et 1045 et *Bull. Soc. chim.* (4), **47**, 1930, p. 95.

(4) *C. R.*, **184**, 1927, p. 1388 et *Bull. Soc. chim.* (4), **41**, 1927, p. 950 et 1380.

en ce métalloïde devait y jouer le rôle favorable d'un engrais. Mais à cause de l'opinion courante en agronomie rappelée plus haut, nous avons cru nécessaire d'en acquérir la preuve par une expérimentation directe.

Nous nous sommes procuré, après de nombreuses analyses, un échantillon de terre arable pauvre en soufre. Cette terre, assez fortement argileuse, provenait de Perrigny, près d'Auxerre; elle nous avait été aimablement procurée par Eug. Rousseaux, directeur de la Station agronomique de l'Yonne (1). Passée au tamis de 1 millimètre, bien mélangée et desséchée à l'air, elle renfermait seulement 0 gr. 114 de soufre total par kilogramme; à côté de cet élément, se trouvait 0 gr. 056 de baryum. En supposant le métal alcalino-terreux à l'état de sulfate, on calcule qu'il pouvait y avoir par kilogramme de terre 0 gr. 013 de soufre paralysé sous une forme très peu soluble et difficilement assimilable (2).

Cette terre a été mise en culture après avoir été partagée en trois séries de pots. La première série servant de témoin, la deuxième a été additionnée d'une quantité de nitrate de baryum correspondant à la transformation totale du soufre présent en sulfate barytique; la troisième, au contraire, a été additionnée d'un peu de sulfate sodique. Ceci étant fait, on a ajouté aux pots des trois séries du phosphate de potassium et du nitrate de sodium en proportions telles qu'il y ait partout autant d'azote et de potassium; enfin, on a semencé avec du colza et comparé les résultats obtenus.

Les sels, quels qu'ils soient, ont été ajoutés peu à peu à la terre, en solutions étendues, et en mélangeant avec soin. On a introduit ainsi, dans chaque kilogramme de terre :

	SÉRIE N° 1 (grammes)	SÉRIE N° 2 (grammes)	SÉRIE N° 3 (grammes)
PO ⁴ HK ²	0,700	0,700	0,700
NO ³ Na.	3,035	2,499	3,035
(NO ³) ² Ba.		0,824	
SO ⁴ Na ² + 10 H ² O.			2,500

(1) Nous avons tenté l'expérience l'année précédente, mais nous l'avions complètement manquée, parce que nous nous étions servis d'une terre de garrigues renfermant des sulfures métalliques (voir *Ann. Inst. Past.*, 49, 1932, p. 495).

(2) *C. R.*, 186, 1928, p. 335 et 477.

Correspondant à :

Phosphore.	0,125	0,125	0,125
Potassium.	0,314	0,314	0,314
Azote nitrique.	0,500	0,500	0,500
Soufre.			0,250

L'eau dont nous nous sommes servis avait été distillée sous pression réduite dans un appareil tout en verre, les bouchons et joints en caoutchouc suffisant à introduire de petites quantités de soufre qui peuvent atteindre et même dépasser le milligramme par litre.

Les pots, en terre cuite, avaient été lavés, séchés, puis imprégnés à fond de paraffine, par immersion dans un bain de cette substance fondue. Il en était de même des soucoupes dans lesquelles reposaient les pots, et des fragments de terre cuite placés au fond de ceux-ci pour faciliter l'aération de la terre. Les pots ne reposaient pas directement sur les soucoupes; ils en étaient séparés par trois petits carrés de verre à vitre paraffinés.

Il y avait dans chaque pot 1.400 grammes de terre séchée à l'air et une quantité d'eau correspondant à 14 p. 100 de ce poids.

Les pots étaient au nombre de trois par série; ils étaient placés sur une table basse, sous un abri vitré qui les garantissait complètement de la pluie, celle-ci apportant toujours des composés solubles du soufre.

Pour éviter les influences du vent, de l'éclairage, etc., dues à la place occupée sous l'abri, les pots des séries étaient intercalés les uns parmi les autres et souvent changés de place.

Les graines ont été réparties, en cercle, au nombre de huit par pot et à la profondeur constante de 5 millimètres. Dans la suite, on n'a conservé que 5 à 6 pieds par pot, en supprimant les germinations les plus tardives.

Le semis a eu lieu le 23 avril, la germination a commencé dès le début de mai, la floraison au milieu de juin et la récolte des fruits mûrs à la fin d'août. Le 11 juin, on a introduit dans chacun des pots une même quantité de phosphate de potassium et de nitrate de sodium égale à la moitié de celle du début.

On s'est efforcé de maintenir le degré primitif d'humidité jusqu'à la fin de l'expérience par de fréquents arrosages à l'eau pure. Au moment des fortes chaleurs, il a fallu faire jusqu'à 6

et même 8 arrosages par jour. C'est dire que l'on a dû employer un grand volume d'eau redistillée, environ 15 litres par pot pendant les quatre mois au moins qui ont séparé le semis de la récolte totale. Les arrosages étaient faits en pluie avec un pulvérisateur. Afin d'éviter le colmatage de la couche superficielle de la terre par l'eau redistillée, on ajoutait



à celle-ci une petite quantité de carbonate de calcium pur (0 gr. 010 par litre). En outre, pour assurer une meilleure répartition de l'humidité, on faisait pénétrer directement une partie de l'eau au centre de la masse de terre par un petit entonnoir placé à demeure.

Les résultats ont été des plus nets. Le 6 juillet, par exemple, au moment où l'on a pris la photographie (1) reproduite ci-dessus, l'aspect et les dimensions des plantes étaient remar-

(1) Elle met en comparaison les pots moyens de chaque série.

quablement différents. Les pieds de colza développés dans la terre sulfatée présentaient déjà de nombreuses siliques et atteignaient une hauteur moyenne de 42 centimètres, tandis que ceux de la terre témoin commençaient seulement à fructifier et n'avaient qu'une hauteur moyenne de 18 centimètres, inférieure à la moitié des précédents. Quant aux pieds de colza de la terre où l'on avait plus ou moins paralysé le soufre par le baryum, ils ne portaient encore aucune fleur et leur taille moyenne atteignait seulement le cinquième de celle des plantes sulfatées. La force des tiges et les dimensions des feuilles étaient aussi remarquables. Dans la suite, ces différences se sont atténuées et, au moment, de la maturation des fruits, les plantes de la terre témoin et, à un degré moindre, celles de la terre barytée, avaient rattrapé en partie les plantes sulfatées.

Le colza est cultivé pour ses graines. Aussi avons-nous attendu la maturité complète de celles-ci pour procéder aux récoltes (du 20 août au 1^{er} septembre). Les graines, les siliques vidées et les tiges avec les feuilles qu'elles portaient encore ont été séparées, séchées à l'étuve à $+110^{\circ}$ et pesées séparément. Dans les tableaux de résultats ne figureront que les poids de substances sèches; les comparaisons seront ainsi plus précises. Faisons remarquer, enfin, qu'au moment des récoltes, quelques pieds ayant défailli au cours de l'expérience, il n'y en avait pas tout à fait le même nombre dans chaque série. Nous donnerons, à cause de cela, à la fois les chiffres bruts des récoltes et ceux rapportés à 100 pieds de colza.

Voici maintenant les résultats numériques obtenus :

SÉRIES	NOMBRE DE PIEDS	SILIQUES				TIGES et feuilles		SUBSTANCES sèches totales	
		Nombre		Poids en grammes		Poids en grammes		Poids en grammes	
		Récolte	Pour 100 pieds	Récolte	Pour 100 pieds	Récolte	Pour 100 pieds	Récolte	Pour 100 pieds
Témoin. . .	16	207	1.294	15,32	95,8	10,74	67,4	26,06	162,9
+ Baryum . .	18	175	.972	11,65	64,7	13,17	73,2	24,82	137,9
+ Sulfate. . .	15	340	2.267	26,43	176,2	20,72	138,4	47,15	314,3

Les siliques ont fourni, après la séparation des graines :

SÉRIES	GRAINES		SILIQUES VIDES		RENDEMENT en graines	
	Récolte en grammes	Pour 100 pieds en grammes	Récolte en grammes	Pour 100 pieds en grammes	Pour cent du témoin	Pour cent du sol barylé
Témoin. . .	7,82	48,9	7,50	46,9	100,0	167,3
+ Baryum . .	5,25	29,2	6,40	35,6	59,7	100,0
+ Sulfate. .	13,44	89,6	12,99	86,6	183,2	306,85

C'est-à-dire que la récolte de graines a fourni avec le colza cultivé dans la terre additionnée de sulfate de sodium un excédent de 83,2 p. 100 par rapport à la récolte obtenue sans cette addition. L'augmentation du rendement atteint même 206,85 p. 100 quand on la compare au cas où les sulfates du sol ont été plus ou moins paralysés à l'état de sel de baryum.

L'insuffisance de la proportion de soufre assimilable contenue dans la terre qui a servi à notre expérience a limité d'une manière très importante l'action des autres facteurs de croissance et, notamment, de l'azote, du phosphore et du potassium ajoutés ici comme engrais de fond. L'industrie des engrais tend de plus en plus à ne fabriquer que des produits chimiques concentrés, comme l'urée ou les mélanges salins dans lesquels l'acide nitrique et l'acide phosphorique sont combinés à l'ammoniac et au potassium. L'agronome qui pratique la culture intensive devra donc, comme l'un de nous l'a déjà recommandé (1), ajouter au moins une certaine proportion de $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ ou de SO^4K^2 , voire de sulfate de Ca, aux engrais chimiques concentrés, mais incomplets, que lui offre l'industrie nouvelle.

(1) *Loc. cit.*

ÉTUDES SUR LA MICROBIOLOGIE DU SOL

(SEPTIÈME MÉMOIRE)

NOUVELLES RECHERCHES SUR LES ORGANISMES DE LA NITRIFICATION

par S. WINOGRADSKY, en collaboration avec HÉLÈNE WINOGRADSKY.

(Avec planches nos V et VI.)

(Clichés de M. Jeantet, microphotographe de l'Institut Pasteur.)

La découverte des agents microbiens de la nitrification est indissolublement liée à la découverte d'une énergétique basée sur l'oxydation des substances inorganiques. Ce n'est que l'idée d'un type physiologique *sui generis*, différent du schéma courant, qui a permis d'isoler les microbes responsables du phénomène et d'établir leurs caractères.

Réciproquement, ce sont ces microbes spécifiques qui sont les représentants les plus intéressants de ce type physiologique, dont on n'avait pas la moindre idée avant les études de l'ainé des auteurs de ce mémoire.

Cette affirmation est tellement vraie que, tant avant qu'après ces études, toutes les recherches, sans exception, qui ne se sont pas guidées par l'idée d'une énergétique spéciale dans ce cas, sont tombées dans des erreurs en confondant des processus et des agents tout différents.

Voici, par exemple, Warington, dont on connaît les études longues et méritoires sur la nitrification, si souvent citées, qui finit par affirmer, après avoir établi quelques résultats parfaitement exacts, que les microbes nitrificateurs sont capables de nitrifier directement l'azote du lait, de l'urine, du bouillon, sans remarquer que cette assertion est en contradiction avec ses observations antérieures jusqu'à les infirmer.

P. et G. Frankland touchent également la vérité sur plusieurs points, sans plus arriver à saisir la vraie nature des

agents nitrificateurs, puisqu'ils leur attribuent la propriété de pulluler abondamment dans le bouillon en le rendant filant, ce qui même leur ferait perdre le pouvoir de nitrifier.

Ainsi donc, les plus importantes des recherches antérieures à celles de l'un de nous ou contemporaines n'ont conduit en fin de compte qu'à des méprises, et on les verra réapparaître sporadiquement jusqu'à une période la plus récente.

Il paraîtrait inutile de revenir sur ces anciens travaux, si on ne se heurtait, assez souvent, dans des mémoires et des traités, à un jugement, qui paraît attribuer la découverte des agents de la nitrification à rien de plus qu'à un progrès de technique : les causes biologiques de la nitrification ayant été, dit-on, connues dans les grandes lignes, manquaient seulement les cultures pures qu'un tel a finalement réussi à obtenir. Nous ne croyons pas d'après ce qui vient d'être dit que cette appréciation trop superficielle soit juste au point de vue de l'histoire du problème (1).

Depuis ces *anciennes recherches* [1] — nous désignerons ainsi celles de l'aîné des auteurs en partie en collaboration avec Omeliansky — quarante ans se sont passés. De nombreux chercheurs ont repris la question, tantôt en suivant la voie tracée par elles, tantôt en s'en écartant dans d'autres directions. Un grand nombre de mémoires ont paru.

Ont-ils apporté des faits nouveaux qui rendraient nécessaire une révision des anciens résultats, sinon en entier, du moins en quelques points importants?

Ont-ils élaboré une méthode nouvelle susceptible de faciliter les études sur ces agents microbiens réputés si difficiles à manier?

Quel est, enfin, le bilan des progrès réalisés dans nos connaissances sur les microbes de la nitrification par les études qui se sont succédé sous l'impulsion de cet ancien travail au cours de cette période si longue?

(1) Ainsi on lit dans le traité de Löhnis : « Das Vorhandensein der zwei Gruppen von Nitrit- und Nitratbakterien haben fast gleichzeitig Warington und Winogradsky erkannt. Erst mit Hilfe der von Winogradsky ausgebildeten Methoden wurde die einwandfreie Isolierung ... ermöglicht, » (*Hand. d. Land. bakt.*, 1910, p. 602.) Ou encore, tout récemment, ailleurs : Nachdem man schon frühzeitig die biologische Natur der Nitratbildung erkannte und manche Autoren bereits Rohkulturen in Händen hatten... hat Winogradsky zuerst Reinkulturen der Bakterien eingestellt. » (*Hand. der Bodenlehre*, 7, Rippel, Niedere Pflanzen, 1930, p. 275.)

La revue critique qui suit est destinée à répondre à ces questions.

Cette revue nous semble d'autant plus nécessaire que des observations douteuses ou inexactes, compliquées de malentendus divers, n'ont jamais cessé de fleurir dans ce domaine en brouillant les notions sur ce problème important de la microbiologie.

Un examen critique de cette œuvre disparate s'impose donc par la force des choses, ne serait-ce que pour débayer le terrain pour de nouvelles recherches.

Revue critique.

Les résultats des *anciennes recherches* sont supposés connus. On aura l'occasion de les rappeler en passant en revue la littérature du sujet et, surtout, en relevant les critiques qui ont été dirigées contre eux.

On commencera par résumer les travaux des bactériologistes et des hygiénistes qui ont repris la question en se tenant à la même méthode et qui sont arrivés aux mêmes résultats.

On fera ensuite un second groupe des travaux qui ont avancé des résultats en désaccord avec eux.

On examinera, enfin, les expériences et les critiques des agro-biologistes et des agro-chimistes, qui s'intéressaient surtout à l'application des caractères de nos agents microbiens au phénomène qui a lieu dans le sol.

Boullanger et Massol (1903-1904), dans deux importants mémoires [2] confirment les données physiologiques acquises en les complétant par des détails intéressants.

Wimmer [3], en Allemagne (1904), dans le laboratoire de Fraenkel, refait pas à pas, avec le plus grand soin, le programme des anciennes recherches, en insistant surtout sur les difficultés de l'isolement et sur le refus de ces microbes de pulluler dans le bouillon de viande peptoné, milieu nutritif que l'on croyait universel. Malgré de nombreux essais, jamais, dit-il, les deux microbes n'ont pullulé dans ces milieux; si l'on constatait un développement, il s'agissait invariablement de formes étran-

gères, incapables de nitritation, ni de nitratisation. L'effet paralysant (antiseptique) des substances organiques, de la peptone en l'espèce, est confirmé. Avec du sable comme support, l'effet nocif est moins prononcé, quoique manifeste.

Schultz-Schultzenstein [4] annonce (1903) avoir réussi à isoler du coke des filtres biologiques de Charlottenbourg un microbe nitrificateur correspondant exactement à la *Nitrosomonas*. Aucun autre organisme actif n'a pu être trouvé.

Harriette Chick [5] (1906) étudie la nitrification et ses agents comme facteurs de la purification des eaux d'égout (sewage). Les conditions des filtres biologiques à filtration continue sont reproduites au moyen de tubes chargés de coke de un à deux mètres de longueur. Les résultats acquis (Winogradsky) sur la nitrification dans le sol, seront-ils applicables à ce cas? Les agents posséderont-ils les mêmes caractères? La sensibilité négative envers les substances organiques (Winogradsky et Omeliansky) paraît à l'auteur, de prime abord, peu probable, car elle est en contradiction flagrante avec les conditions mêmes de leur activité dans les eaux résiduaires.

Dans une première expérience, le filtre ne montre les premiers débuts d'oxydation qu'au bout de cinq semaines; c'est alors le *nitrite stage* qui se développe sans la moindre production de nitrate: cette dernière ne commence qu'au bout de huit semaines, pour devenir exclusive au bout de quatre mois. Dans un milieu neuf, c'est-à-dire, *non peuplé* par les microbes spécifiques, le processus marche donc, malgré une aération aussi parfaite que possible, exactement comme il est décrit pour les cultures en milieu liquide (Winogradsky), mais cela seulement à condition que le taux pour cent d'ammoniac soit suffisant pour paralyser l'action de l'agent de la nitratisation: dans cette expérience ce taux était de 15 pour cent mille (1). Dans une seconde série d'expériences, le liquide n'en contenait que 2 à 4 pour cent mille, et là les deux phases n'étaient plus si nettement séparées et tendaient à se confondre.

Dans ses investigations bactériologiques, l'auteur n'épargne

(1) A comparer: Winogradsky et Omeliansky, Sur l'influence des substances organiques: « l'effet déprimant de l'ammoniac est manifeste depuis la dose de 5 pour million, la dose limite est atteinte à 15 pour cent mille » *loc. cit.* *Lafar's Handbuch* (p. 176).

pas ses efforts pour vérifier ce caractère négatif de ne pas pulluler aux dépens d'aliments organiques, caractère qui lui a paru incompatible avec les conditions mêmes de l'activité de ces agents. Des eaux d'égout, il isole au moyen de la gélatine nutritive 40 formes, des pullulations sur bouillon 70 formes : aucune n'est capable de nitrifier. Les mêmes essais sont refaits pour isoler un agent de la nitrification : mais des 40 formes isolées sur milieux courants aucune n'en est capable. Il est donc évident, conclut l'auteur, que contrairement à l'attente (*contrary to expectation*), aucun des agents microbiens de la nitrification ne pullule aux dépens des aliments organiques. Au moyen de plaques de silico-gel (formule Winogradsky), il réussit à isoler un microbe à peu près sphérique, ressemblant à la *Nitrosomonas*. Pour le *Nitrobacter* l'isolement réussit au moyen de la gélose nitritée (Winogradsky).

La thèse de Roubel [6] (1913, 200 pages, en russe) exécutée dans le laboratoire d'Omeliânsky a pour tâche d'isoler les agents nitrificateurs des filtres biologiques et d'éprouver l'influence de diverses substances dissoutes dans les eaux résiduaires sur leur activité. Le microbe de la nitrification lui paraît morphologiquement quelque peu différent du microbe de la même fonction du sol de Petersbourg ; celui de la nitrification ne se distingue pas du *Nitrobacter*. Ce qui paraît propre, d'après l'auteur, aux microbes des installations sanitaires, c'est leur sensibilité moindre envers les substances organiques. Ils se montrent tout de même incapables de se développer aux dépens du sucre, peptone et autres aliments organiques.

Une place à part dans la file des recherches microbiologiques est due à trois importants mémoires de Meyerhoff, *Untersuchungen über den Ahtmungsvorgang nitrifizierender Bakterien* parues dans les Archives de Pflüger en 1916 [7].

En se servant de cultures des deux microbes mises à sa disposition par Omeliânsky, il reprend l'étude de leur physiologie au moyen d'une méthode toute différente : il se sert de la technique de Warburg, qui permet de mesurer la consommation de l'oxygène et le produit d'oxydation qui lui correspond, dans une culture en pleine pullulation, au cours d'une période ne dépassant pas quelques heures. La méthode est précieuse en ce sens qu'elle fournit le moyen de dégager le processus de res-

piration, qui aboutit dans ce cas à la production de nitrite et de nitrate, des processus de croissance, et de donner ainsi une vue plus claire sur l'énergétique propre à ces organismes.

Tous les caractères physiologiques attribués à ces microbes par les anciennes recherches ont été soumis à une vérification au moyen de cette méthode, particulièrement la chimio-synthèse. Pour le microbe de la nitrata-tion, la démonstration n'était jusqu'alors que qualitative : pullulations dans une solution privée de toutes traces de carbone organique, en présence de l'acide carbonique, mais refus de tout développement en l'absence de ce dernier. L'analogie complète entre ce cas et celui de la nitrata-tion, où la démonstration en a été quantitative, paraissait suffire pour l'admettre également pour la nitrata-tion : mais cette analogie n'a pas empêché Beijerinck de mettre ici la chimio-syn-thèse en doute. Meyerhoff se charge d'en apporter toutes les preuves quantitatives désirables, et cela au moyen de deux méthodes : 1° détermination du gain en carbone combustible dans les cultures ; 2° mesures calorimétriques. Les expériences d'après la première donnent un rapport N : C égal à 135, 131, 146, 128, d'où l'on voit, conclut l'auteur, que pour la nitrata-tion également, ce rapport paraît constant à 10 p. 100 près (Winogradsky). Quant à la calorimétrie, les mesures ont montré qu'en dehors de l'oxydation du nitrite et de l'assimilation de l'acide carbonique, aucune réaction énergétique ne prend part au métabolisme.

Seul, l'ion NO_2 peut servir à la respiration ; celle-ci ne marche donc que dans la mesure de la dissociation des nitrites, dont les cathions sont indifférents au processus.

La respiration réagit immédiatement à la pression partielle de l'oxygène : à une demi-atmosphère elle baisse de 20 p. 100, à 1/5 d'atmosphère de 43 p. 100, à 1/10 de 66 p. 100, à 1/12 de 80 p. 100.

Entre pH 8,3 et 9,3, la respiration ne change pas ; à droite et à gauche de cette zone optima elle tombe rapidement à 0.

Remarquons tout de suite, que cette observation n'est valable que pour la souche qui a servi aux expériences de cet auteur.

L'ammoniac libre, soit ses sels dans une solution à pH élevé, entravent la respiration (Winogradsky et Omeliansky), et l'effet croît à mesure que le pH s'élève.

Le glucose, la peptone, l'asparagine, l'urée qui paralysent la croissance à de très faibles doses (Winogradsky et Omeliansky), n'agissent qu'à des doses plus fortes sur la respiration : la membrane plasmique des cellules adultes étant probablement capable de retarder la pénétration des substances étrangères au métabolisme (*zellfremde Stoffe*) dans la cellule.

Le troisième mémoire traite de la nitrification. L'aliment dans ce cas serait le NH_3 , c'est-à-dire que les sels ammoniacaux doivent subir une dissociation. L'optimum de la respiration correspond à $\text{N}/200 \text{ NH}_3$, c'est-à-dire à 90 milligrammes pour 1 litre ou 660 milligrammes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; à la dose de 0,1 p. 100 de ce sel, la respiration serait déjà moins intense.

Jusqu'à 1/2 atmosphère la respiration ne baisse pas, à 1/3 elle baisse seulement de 8 p. 100, à 1/5 de 32 p. 100, à 1/10 de 65 p. 100, à 1/20 de 84 p. 100.

La zone optima de pH serait très limitée soit de 8,4 à 8,8. A 9,4-9,5 plus de respiration ; à 7,5 également.

Répétons encore une fois que ces données n'ont trait qu'à la souche qui a servi aux expériences.

Quant à l'effet entravant des substances organiques, le glucose agit, ici aussi, moins sur la respiration que sur le développement. Tout autre serait le cas avec les substances aminées : ainsi l'urée à 0,025 mol. fait baisser la respiration de 27 p. 100, à 0,05 de 58 p. 100, à 0,10 de 77 p. 100 ; l'asparagine à 0,005 de 34 p. 100, à 0,01 de 70 p. 100, à 0,02 de 80 p. 100.

Nous avons tenu à résumer avec quelques détails ces importantes recherches, lesquelles, en confirmant les anciennes données physiologiques datant alors déjà d'une vingtaine d'années les ont en quelque sorte modernisées, en y introduisant des notions nouvelles, qui n'existaient pas encore à l'époque de leur publication.

Vers 1919, la question passe en Amérique. Gibbs [8] croyant que les expériences de Winogradsky n'avaient jamais été répétées en reprend tout le programme. Il s'assure qu'une très longue culture d'enrichissement (jusqu'à 50 générations) ne permet pas d'éliminer les germes étrangers ; l'isolement des deux microbes lui réussit au moyen des formules indiquées. Il se sert du bouillon comme *test* de la pureté.

Augusto Bonazzi [9], dans une série de quatre mémoires (1919 à 1923), traite d'un *Nitrosococcus*, qu'il croit identique à celui qui a été isolé par Winogradsky des terres d'Amérique. Il exécute avec ce microbe des expériences de production intense de nitrite en solution; il étudie l'action de l'acide carbonique sur ses pullulations; il s'occupe, enfin, du rôle des sels de fer dans l'oxydation.

Fred et Davenport [10] étudient spécialement l'effet des substances organiques sur le *Nitrobacter*, isolé au moyen de la gélose nitrifiée. Le microbe ne se reproduirait pas dans l'urine, le bouillon de viande, la solution de Nährstoff Heyden; peut-être, ajoutent les auteurs, il y a légère multiplication dans la gélose additionnée de ce dernier produit. Ils insistent *contra* Beijerinck (voir plus bas) que ce microbe, qu'ils maintiennent dans du bouillon de viande (où il garde le repos), jusqu'à six semaines ne perd pas sa fonction nitrifiante, qu'il reprend aussitôt introduit dans une solution minérale nitrifiée.

Après tant de vérifications et de répétitions, le sujet ne semble pas encore vieillir comme thème d'études, car, passé quelques années, l'an 1929 apporte quatre travaux, dont trois rentrent dans la catégorie de ceux qui suivent le programme des anciennes recherches.

Heubült [11] refait les cultures électives en solutions, se plaint des difficultés de débarrasser les germes spécifiques des impuretés; ne réussit pas, même à la suite de plusieurs repiquages sur plaques de silico-gel, à avoir des cultures supportant le *test* du bouillon; est obligé en fin de compte à recourir à la méthode de dilution, au moyen de laquelle il n'obtient qu'au bout de six mois une nitrification par un microbe qui ne pullule pas dans les milieux nutritifs organiques et qui présente les caractères morphologiques de la Nitrosomonade. Sur ce microbe, l'influence des substances organiques est réétudiée: moins sensible au glucose, il est plus sensible à la peptone.

Horst Engel [12] soumet le microbe isolé par Heubült à des expériences d'assimilation de l'acide carbonique. Il confirme la chimio-synthèse en se servant d'un appareil de micro-dosage très sensible qu'il a construit.

Roubentchik [13] recherche les microbes nitrifiants dans un

milieu spécial, les lacs salés, les *limans*, du voisinage d'Odessa. Il y trouve un microbe de nitrification halophile, qu'il isole à l'état de pureté, non sans difficulté et, bien entendu, il éprouve sa réaction envers les substances organiques — glucose, peptone, etc. — laquelle se montre sensiblement pareille à celle qui a été consignée dans les anciennes recherches (Winogradsky et Omeliansky).

Enfin, Nelson [14] publie en 1931 un mémoire détaillé qui reprend une fois de plus les mêmes questions selon l'ancien programme. Cet auteur, dans un premier mémoire (voir ci-dessous), n'a pas réussi dans sa tâche d'isoler des agents de la nitrification en se servant d'une solution additionnée d'aliment organique (sucre). Cette fois, il évite cet écueil en appliquant l'isolement au moyen d'un micro-manipulateur (*single-cell technique*). Il y parvient avec les deux et il retrouve les caractères tant de fois décrits. Il croit observer une tolérance plus grande des souches isolées envers le dextrose, la peptone, la glycérine; mais il constate en même temps que le dextrose n'est pas attaqué, car la dose ajoutée ne subit aucune diminution. Il complète ses expériences d'inhibition, en ajoutant aux cultures en solution minérale de matières végétales diverses — paille de froment, de seigle, d'avoine, de luzerne, ainsi que du fumier — séchées et réduites en poudre. Dans tous ces cas, toute pullulation aurait été paralysée, et même la Nitrosomonade aurait péri, car les réinoculations n'ont donné lieu à aucun processus.

Passons maintenant aux recherches qui ne sont pas d'accord avec les anciens résultats en ce qu'elles affirment l'existence de microbes nitrificateurs de caractère tout différent, qui ne seraient guère gênés par les aliments organiques, mais qui les réclameraient au contraire pour leur activité.

Les plus anciennes de ce groupe, qui ont les premières attiré l'attention, sont celles de Stutzer [15] et de ses collaborateurs Burri et Hartleb sur un certain *Hyphomicrobium*, ou *Salpeterpilz*, très pléomorphe, capable de nitrification et de fonctions diverses. Mais il n'y aurait rien à en dire, car Stutzer a bientôt loyalement rétracté ses assertions en se déclarant d'accord avec les données de Winogradsky [15]. D'autres ne l'ont pas fait, et

cependant la raison du désaccord a été toujours la même : la difficulté très grande d'isoler les nitrificateurs dans un milieu additionné d'aliments organiques. Il s'y produit un mélange qui trouble les bouillons nutritifs, qui nitrifie dans la solution saline, qui est capable, enfin, de nitrifier le bouillon de viande lui-même, si on lui laisse le temps. Une expérience ancienne d'Omeliansky, si simple et si claire, illustre très bien les activités multiples de ce mélange : en combinant diversement *B. ramosus*, *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* pour les ensemercer dans du bouillon peptoné, il a eu pour les combinaisons :

B. ramosus + *Nitrosomonas* + *Nitrobacter*, production de nitrate;

B. ramosus + *Nitrosomonas* production de nitrite;

B. ramosus + *Nitrobacter*, rien que de l'ammoniac;

Nitrosomonas + *Nitrobacter*, aucun trouble, aucune action.

Si donc, le chercheur ne se méfie pas, s'il admet trop tôt l'isolation à l'état de pureté, il réalisera avec sa culture ces réactions positives et il y trouvera confirmation de sa conception d'une espèce hétérotrophe à fonction multiple, capable de nitrifier et de nitrater l'azote organique et minéral en pullulant dans les bouillons et dans les solutions minérales nitrifiables.

La technique si grossière de Fremlin [16], ainsi que de Sack [17] — que l'on ne manque pas pourtant de citer en traitant de la nitrification — ne laisse aucun doute sur la présence d'espèces hétérotrophes, de tout un assortiment même, dans leurs expériences (1).

Des méprises de ce genre sont, à vrai dire, difficiles à éviter, si l'on n'est pas mis en garde par l'idée d'une énergétique spéciale, à en juger par ce qu'un maître comme Beijerinck [18] ne l'a pas su, en affirmant que le microbe de la nitratisation, dénommé par lui *Nitrobacter oligotrophum* ne serait « héréditairement stable » qu'en l'absence de matières organiques solubles; plus abondamment nourri, par exemple, dans du bouillon peptoné, il se transformerait immédiatement en *Nitrobacter polytrophum*, en perdant pour toujours son pouvoir de

(1) Du reste, Fremlin dans son second mémoire ne s'applique qu'à démontrer que les liquides organiques — urine, lait, etc. — peuvent subir une nitrification au bout de longs mois, sans même chercher à dégager l'activité des nitrificateurs. Le fait connu depuis plus d'un demi-siècle n'avait guère besoin d'une nouvelle confirmation.

nitratation; même de faibles doses d'aliments organiques ne dépassant 1/20 p. 100 de glucose, de peptone, d'asparagine, d'acétate de soude, etc., suffiraient pour provoquer cette transformation. C'est que croissance et nitrification seraient des fonctions incompatibles, cette dernière ne pouvant se déclencher qu'après un arrêt complet de la végétation occasionné par la disparition des dernières traces d'aliment organique. Car l'état oligotrophe ne serait guère capable de chimio-synthèse; cette faculté lui aurait été attribuée à tort.

La critique de cette théorie extravagante, en ce qu'elle envisage la nitrification — phénomène de grand rendement — comme une sorte de phénomène d'inanition, par conséquent pathologique, a été faite ailleurs (19); ici mention n'est faite de ce travail que comme exemple particulièrement démonstratif d'une erreur devenue chronique dans le cours de cette quarantaine d'années. On pense qu'elle aurait bien pu être évitée par ce maître en bactériologie, s'il avait plus tenu compte des anciennes recherches (Winogradsky).

Une autre source de méprise est à chercher dans l'emploi du réactif de Peter-Griess d'une extrême sensibilité, car il décèle l'acide nitreux à la concentration de 1/1 000 de milligramme par litre. Or, l'acide nitreux est très répandu dans l'air des laboratoires, source d'erreur qui a été abondamment discutée dans des publications déjà anciennes (1).

La source en est non seulement en dehors des cultures, mais encore dans le milieu même, qui peut contenir des traces de *nitrate* indécélables (car une réaction pareillement sensible pour les nitrates n'est pas connue), qui donnent à la réduction des nitrites décelables au moyen de cette réaction d'une sensibilité extrême.

Malheureusement, on n'a pas assez tenu compte de ces sources d'erreur, et il n'y a eu que trop d'observateurs qui ont rapproché de la nitrification tous les cas où la réaction de Peter-Griess était positive, malgré les traces infi-

(1) « Il faut bien se garder de conclure à la nitrification aussitôt que l'on obtient la réaction de Trommsdorf ou de la diphenylamine » (à plus forte raison celle de Peter-Griess). « Ce qui donne raison de l'admettre, c'est que le processus une fois commencé ne s'arrête pas avant la transformation complète de toute la quantité d'ammoniac ou de nitrite ». (Article de Winogradsky dans le *Handbuch* de Lafar, 1904-1906, p. 139-141.)

nitésimales et variables de nitrite qu'elle indiquait et les phénomènes de réduction qui dominaient très nettement dans les cultures.

Runow [20 et 21], Mischoustine [22], Goubine [23] se gardent, il est vrai, de confondre cette production éphémère de nitrite avec le processus vrai de la nitrification ; ils y voient, tout de même, une source nouvelle de nitrite dans la nature. Remarquons qu'elle n'est pas si nouvelle que ces auteurs pensent, car encore Heraeus [24], en 1886, attribuait un pouvoir nitrificateur à presque toutes les espèces qui ont servi à ses expériences, à savoir, *Micrococcus prodigiosus*, les spirilles du fromage, la bactériidie charbonneuse, les staphylocoques pyogènes et bien d'autres.

Les *nitrifying organisms* isolés par Nelson [25] dans son premier travail (1929) sont du même genre. Il serait inutile de l'analyser car, dans son second travail déjà mentionné, l'auteur a trouvé moyen de s'attaquer à l'étude des agents non douteux de la nitrification.

Le travail de Cutler et Mukerdji [26] appelle quelques remarques, car ces auteurs croient avoir apporté les preuves que les nombreuses espèces isolées par eux au moyen de la gélose mannitée de Thornton, sont à considérer comme exerçant la nitrification dans le sol. Or, l'expérience avec la terre stérilisée, additionnée d'une dose assez forte de sulfate d'ammoniac,ensemencée avec les prétendus nitrificateurs n'a donné au dosage que 2 milligrammes d'azote nitreux par kilogramme de terre au maximum, et encore cela qu'une seule fois, le reste bien au-dessous, jusqu'à traces ou néant ; il est donc beaucoup plus vraisemblable d'attribuer ces traces à la réduction des nitrates que la terre régulièrement fumée de Barnfield (à Rothamsted) contenait sûrement, qu'à l'oxydation de l'ammoniac, laquelle, présente à la dose de plusieurs centaines de milligrammes par kilogramme, n'a évidemment subi aucune oxydation appréciable. Sur ce point, le résultat de l'expérience est nettement négatif, et l'on s'étonne que les auteurs ne l'aient pas remarqué. Il est également plus que probable que les traces infinitésimales de nitrite dans les expériences en solution sucrée sont attribuables à la même cause, c'est-à-dire à la réduction de traces de nitrate préexistant dans les liquides. La terre témoin

et les fioles stérilisées et non ensemencées n'ont pas donné la réaction n'ayant subi, évidemment, aucune réduction.

Il y aurait encore lieu de se demander si le métabolisme des espèces hétérotrophes ne peut donner lieu à la production de quelque autre substance qui agit sur ce réactif si sensible et si instable. Mais cette question n'intéresse le problème de la nitrification qu'au point de vue des erreurs possibles de ce chef, car il est clair qu'il n'y a pas lieu d'interpréter le fait de l'apparition de traces fugaces d'acide nitreux (si c'est vraiment de lui qu'il s'agit), comme une sorte de nitrification différente à rendement faible, mais agencée par un nombre plus grand d'espèces. Il n'en saurait être question, pour la raison si évidente que l'on ne trouve pas dans le sol, ni dans les égouts, du sucre savamment combiné avec des acides organiques et de l'ammoniac (ce qui paraît favoriser l'apparition de la réaction de Peter-Griess), et encore parce que ces producteurs éphémères, s'ils le sont réellement, se heurteraient dans le sol à des espèces autrement actives qui ne leur laisseraient pas le temps d'exercer leur activité.

Tous les travaux mentionnés jusqu'ici ont traité la question du point de vue de la microbiologie et de la physiologie générale, ceux auxquels nous passons maintenant s'intéressaient, en premier lieu, à l'application des données acquises au phénomène de la nitrification *au sein du sol*. Or, ces données nouvelles heurtaient les notions classiques de l'agrichimie, selon lesquelles le nitrate est le seul produit normal de la nitrification, les nitrites n'apparaissant que comme indices d'une oxydation défectueuse; et quant à l'intolérance des nitrificateurs envers les aliments organiques, ainsi que du microbe de la nitratisation spécialement envers l'ammoniac, on était enclin à les envisager, pour des raisons que l'on comprend, comme difficiles à concilier avec leurs fonctions et les conditions où elle s'exerce.

C'est Löhnis ²⁷ qui s'est fait interprète de ces objections dans sa critique dirigée contre « les deux thèses de Winogradsky ». D'après lui, la succession des deux phases de la nitrification ne serait due qu'à la composition du milieu de culture, dont se servait Winogradsky: en baissant la dose de

sel ammoniacal et en remplaçant le carbonate de magnésie par le carbonate de chaux, on obtiendrait facilement une nitratisation directe de l'ammoniac, sans qu'une action entravante de la part de cette dernière se fasse sentir.

De même que l'effet de l'ammoniac n'aurait rien de spécifique, les substances organiques n'exercent aucune influence sur le phénomène au sein du sol ; il suffit que ces substances, ainsi que l'ammoniac, n'y soient présentes à un taux exagéré, ce qu'elles ne sont jamais dans le sol. En somme, ces intolérances prétendues immanentes aux microbes ne joueraient que dans les conditions anormales du milieu de Winogradsky et Omeliansky, il n'y aurait pas à compter avec elles dans la nature. Là, ce serait plutôt l'aération qui règle la marche des phénomènes, de manière que la nitrification, favorisée par un libre accès de l'air, est remplacée par la dénitrification quand l'aération devient défectueuse.

On connaît — on connaissait déjà à cette époque — les raisons de la nitratisation *directe* dans le sol, dont la principale est celle que le milieu est *déjà peuplé* par les microbes spécifiques : car c'est principalement le développement du microbe nitrifique et non le processus d'oxydation exercé par les cellules adultes, qui est si sensible aux ions NH_3 . Et puis, il y a la question de dose : en baissant le taux d'ammoniac, on avance la nitratisation, en élevant on la recule — ce sont donc les mêmes facteurs qui régissent la marche du phénomène, aussi bien dans une fiole qu'au sein du sol. Il n'y a que les rapports quantitatifs qui sont différents. Löhnis a oublié, de plus, que le problème n'est pas limité à la terre *arable*, — milieu toujours peuplé par les nitrificateurs et toujours très pauvre en substances organiques et en ammoniac, — mais qu'il existe beaucoup de milieux *neufs*, qui sont très riches en ces substances et en ammoniac : déchets et immondices, champs d'épandage, filtres biologiques, etc. Du reste, même dans le sol, le phénomène ne se passe pas toujours de la même manière, selon l'ancien schéma des agro-chimistes ; par exemple, dans des sols forestiers ou terres de marais mises en culture, qui ne sont pas encore peuplées par des agents de la nitrification, le processus a tendance à devenir à double phase comme dans les cultures sur milieux artificiels. Bien

plus, on trouve assez souvent des sols d'ancienne culture, où la phase nitreuse est nettement séparée de la phase nitrique, cette dernière toujours beaucoup en retard : ce qui dépend évidemment de la densité et de l'activité relative des deux groupes de microbes.

Enfin, quant à l'aération comme facteur déterminant l'alternance de la nitrification d'un côté, de la dénitrification d'un autre, l'assertion ne repose sur aucune observation probante. Elle est entièrement invraisemblable : on ne voit pas comment le facteur aération pourrait départager les deux processus antagonistes dans le temps, la dénitrification n'exigeant pas une anaérobiose absolue, la nitrification pouvant marcher, de son côté, à une aération très réduite; s'il n'y avait donc d'autres facteurs actifs, les deux processus pourraient marcher en même temps, et le résultat inévitable en serait la perte totale du nitrate formé. Car il est hors de question que le rendement d'un phénomène lent, comme la nitrification, puisse dépasser ou même couvrir les pertes occasionnées par un processus rapide et violent comme l'est la dénitrification. Le fait même que la nitrification de l'azote aboutit régulièrement à l'accumulation de nitrate dans le milieu, nous démontre qu'il existe un facteur plus sûr pour séparer les deux processus antagonistes. Ce facteur, il a été nettement indiqué comme conclusion du mémoire de Winogradsky et Omeliansky (1899) : *c'est l'intolérance des deux microbes spécifiques envers les substances organiques qui retarde leur activité jusqu'à la dégradation de ces substances, quand le milieu devient inapte à la pullulation des dénitrificateurs; à cette intolérance commune s'ajoute la sensibilité du microbe de la nitrification envers les ions NH_3 , ce qui retarde encore son ingérence en la reléguant au tout dernier tour dans la série des phénomènes qui composent l'épuration.*

La critique de Löbnius nous a donné l'occasion de rappeler cette conclusion qui n'a pas attiré l'attention qu'elle mérite, peut-être à cause même de cette critique. Pourtant elle se présente à l'esprit, comme *l'un des plus importants rouages qui règlent la succession des activités microbiennes dans la nature.*

Cette même critique paraît avoir inspiré toute une suite

d'expériences qui s'attaquèrent à la thèse combattue par Löhnis touchant l'effet des substances organiques.

Leslie Coleman [28], dans un long travail opère principalement avec des portions de terre non stérilisées, additionnées de doses croissantes de sucre et il croit observer, que le sucre active la nitrification. Des expériences avec des cultures d'une pureté douteuse, ne lui donnent pas de résultats assez stables; la peptone, l'asparagine, l'urée se montrent d'un effet nettement entravant; les essais pour remplacer l'acide carbonique par le dextrose comme source de carbone échouent, les microbes de la nitrification se refusant à pulluler sans ce gaz comme source de carbone; l'auteur tient pourtant, malgré tous ces faits négatifs, à une *action stimulante* exercée par le glucose, dont il avoue ne pouvoir s'expliquer la nature.

Stevens et Withers [29], en expérimentant avec de la terre stérilisée, additionnée de peptone, de fumier, etc., et parallèlement avec une solution additionnée des mêmes substances, les deux ensemencées avec une suspension de terre, concluent que la substance organique n'est pas nécessairement défavorable à la nitrification, et que l'application directe des conclusions de Winogradsky à la terre des champs doit être abandonnée.

Des observations de même genre sont publiées par Bazarewsky, Karpinsky et Niklewsky [30], B. Niklewski [31], avec toujours la même conclusion et toujours sans s'astreindre à bien dégager le rôle des différents agents, dont les activités se superposent dans le phénomène brut. De ce fait, le malentendu se développe peu à peu, qui attribue à Winogradsky et à Winogradsky et Omeliansky l'affirmation — si contraire à la réalité — d'une action toujours nocive des substances organiques sur le phénomène naturel de la nitrification.

On la juge inacceptable. Particulièrement, Kruse [32], la condamne dans le *Handbuch für allgemeine Microbiologie*. Il pense que la thèse combattue par Löhnis et d'autres est devenue caduque (*hinfällig*).

C'était mal comprendre, ou même mal lire, le mémoire détaillé qui s'en occupe (Winogradsky et Omeliansky) [1899]. Il n'y s'agit guère du phénomène brut ou naturel, mais de la réaction des agents microbiens isolés à l'état de pureté contrôlée, irréprochable. La réaction négative n'avait rien d'absolu,

mais était déterminée par la qualité et la quantité des substances éprouvées. Le petit tableau qui résume les doses et les effets obtenus a été reproduit tant de fois dans les mémoires et traités qu'il est inutile de revenir ici au détail des résultats. Rappelons seulement que distinction a été faite entre les doses simplement retardantes, qui ont été très faibles, et les doses paralysantes; quant aux doses microbicides, elles n'ont pas été atteintes. L'observation a été déjà consignée (confirmée plus tard pour Boullanger et Massol, puis par Meyerhoff, que ces substances entravent surtout le développement, mais qu'elles agissent beaucoup plus faiblement sur le processus d'oxydation, de sorte que dans une culture déjà peuplée, le processus s'en ressent beaucoup moins (expérience n° 2). On avait noté déjà qu'il est possible d'accoutumer par des réensemencements le *Nitrobacter* à des doses graduellement croissantes de substances organiques (expériences n° 24, 27, 32). On a observé, enfin, une sorte d'activation du processus d'oxydation par de petites doses de substances organiques (expériences n° 2, 11, 18, 19), particulièrement, par le glucose et des infusions des matières végétales : les cultures qui en contenaient arrivant au terme un ou deux jours plus tôt que les témoins. Mais on ne s'est pas hâté d'interpréter ce fait comme une action *stimulante* propre à ces substances, mis en garde que l'on était par l'observation qu'une légère amélioration du liquide de fond (en augmentant la dose de fer dans l'expérience n° 40) suffisait pour effacer complètement le petit écart en faveur des solutions additionnées de substances organiques.

Actuellement, quand la notion du pH qui manquait alors est présente à tous les esprits, on n'a qu'à se louer de cette hésitation, car il n'est que trop évident que les substances organiques peuvent modifier, dans un sens ou dans un autre, la concentration en ions hydrogènes : particulièrement le sucre (expériences de Coleman), dont la décomposition donne lieu à la production d'acides transformés ensuite en carbonates. Les infusions végétales, toujours légèrement acides, peuvent aussi modifier le pH dans un sens favorable, s'il est trop alcalin pour la souche qui sert aux expériences.

En résumé, quoique une action stimulante à quelque titre, sous forme de catalyse par exemple, ne soit pas invraisemblable,

on ne trouve dans la littérature du sujet aucune expérience dont les résultats pourraient être interprétés dans ce sens.

De l'opinion de Waksman, qui admet expressément cet effet stimulant, nous ne voyons pas les raisons (*Principles of Soil Microbiology*, p. 60).

Arrivé à la fin de notre revue, il nous reste à tirer le bilan de ces quarante ans de travail collectif.

Commençons par noter, que ce travail a confirmé tous les résultats des *anciennes recherches*. Si l'on trouve quelques différences de détail, cela s'explique aisément par ce que les différents observateurs dans les différents pays ne travaillaient pas avec les mêmes souches.

Il a été mis hors de doute que les agents actifs sont à chercher exclusivement dans le groupe physiologique, dont l'énergétique est basée sur l'oxydation des substances inorganiques : les autotrophes.

Tous les efforts pour trouver des hétérotrophes capables d'exercer cette fonction ont échoué et n'ont abouti qu'à des méprises.

Il s'est confirmé que les agents spécifiques se classent par leur fonction en deux groupes : ceux de la nitrification et ceux de la nitrification, sans que l'on ait jamais trouvé un organisme capable d'exercer l'oxydation des ions NH_3 directement en acide nitrique.

Un seul auteur [33] a affirmé il y a vingt-cinq ans, l'existence d'un bacille capable de nitrifier directement l'azote ammoniacal, le *Bacillus nitrator*; il a même pressenti l'existence d'un autre genre dont la fonction serait de nitrifier directement l'azote gazeux de l'air. Ce n'était évidemment que des hypothèses audacieuses, qui ne se sont pas confirmées (1).

(1) Malgré son caractère précaire, cette découverte est citée dans tous les traités jusqu'à ce jour. Récemment Rippel (l. c. p. 273), sans reconnaître l'existence du *nitrator* comme prouvée, croit tout de même devoir remarquer que la fonction qu'on attribue à ce bacille est parfaitement possible (*durchaus möglich*). De quelle possibilité s'agit-il? La question est bien de savoir si cette oxydation est non chimiquement, mais biologiquement possible, et la réponse affirmative ne pourrait être justifiée que si l'on trouvait un organisme qui en soit capable. S'il existait, en réalité, il n'aurait pas été si difficile de le trouver, car il révélerait sa présence lui-même en rendant la nitrification indissociable en deux phases. Or, cela n'a été jamais irréprochablement

Il a été établi, en outre, que les caractères physiologiques immanents aux bactéries de la nitrification exercent une influence décisive sur la marche du phénomène brut de la nitrification de l'azote organique, en séparant dans le temps les processus de dégradation des molécules organiques des processus d'oxydation de l'ammoniac formé.

Une dernière conclusion, enfin, est à tirer des travaux que nous venons de passer en revue, — revue que l'on aurait bien pu abréger, s'il ne s'agissait que d'étayer les anciens résultats, — mais notre but était de montrer plutôt que la connaissance de ces microbes importants n'a fait que très peu de progrès, et que, surtout, aucune nouvelle méthode n'a été tentée pour faciliter et étendre leur étude. Tous les auteurs se sont tenus strictement à l'ancien programme, à savoir : 1° culture élective ou d'enrichissement, dans la solution ammoniacale et nitreuse ; 2° isolement à l'état de pureté au moyen des milieux et formules consacrés ; 3° chimio synthèse ; 4° influence des aliments organiques et de l'ammoniac sur les deux agents. Les recherches, pourrait-on dire, ont tourné en rond autour de ce programme. Il paraît que ce thème gardait si longtemps son attrait de nouveauté, et que la difficulté de la technique minutieuse nécessaire pour isoler les microbes à l'état de pureté absolue, tentait à les redécouvrir dans les différents sols de différents pays.

Cependant, il était clair, depuis longtemps, qu'il y aurait grand avantage à remplacer le procédé long et laborieux, dont on a été obligé de se servir pour isoler ces agents la première fois, par un autre, beaucoup plus expéditif, faute de quoi le problème serait condamné à avancer avec trop de lenteur. C'est particulièrement un nombre de questions touchant le rôle de ces microbes dans la nature, qui n'enregistraient aucun progrès en présentant beaucoup d'obscurité.

Mais avant de passer à une critique approfondie de la méthode et à la description de la nouvelle, il nous reste à examiner deux questions : 1° la question du *pH* que recherchent nos microbes

constaté. Il est donc logique de conclure qu'un processus de ce genre paraît biologiquement impossible et, par conséquent, prendre enfin la décision de rayer ce *Bacillus nitrator*, au bout de vingt-cinq ans d'existence purement fictive, du nombre des microbes nitrificateurs.

dans la nature ; 2° les méthodes en cours pour étudier le pouvoir nitrificateur des sols ; les deux de date relativement récente.

LA QUESTION DU pH . — La notion du pH , aussitôt établie, s'est imposée dans le domaine de la nitrification, comme dans tous les autres domaines de la Microbiologie. Les observations anciennes avaient établi qu'une réaction alcaline et la présence d'une base carbonatée est nécessaire pour que le processus puisse se développer. Meyerhoff, comme on l'a vu, a constaté dans ses expériences sur la respiration des agents de la nitrification, qu'un pH élevé est nécessaire pour les deux, à savoir 8,4 à 8,8 pour la nitrification, et 8,4 à 9,3 pour la nitratisation. Mais ce fait se trouva bientôt en contradiction avec les études du processus ayant lieu dans les différents sols. Ritter [34], Arnd [38], Weiss [37], Barthel [36], Hall, Miller et Gimmingham [35], en étudiant les sols de Suède, de Danemark, de l'Allemagne, de l'Angleterre, ont constaté que le phénomène peut avoir lieu dans des sols nettement acides. Ces observations ont frappé comme incompatibles avec les données classiques sur les conditions obligatoires du phénomène. « D'où provient la nitrification dans le sol acide », remarque Barthel, à la suite d'une expérience avec un sol de ce genre, « s'agit-il de formes connues spécialement adaptées au milieu acide, ou bien d'agents encore inconnus, nous n'en savons encore rien ».

La question du pH a été ainsi liée d'emblée à la question de la multiplicité des souches, qui seraient adaptées à des conditions différentes d'activité.

Le problème est traité avec le plus d'ampleur dans les recherches très étendues de Gaarder et Hagem [39] qu'il nous suffira d'analyser, pour être au courant de l'état actuel de la question.

Les expériences extrêmement nombreuses de ces savants norvégiens, qui ont porté sur 142 échantillons de sols provenant d'une centaine de localités, ont été disposées toutes selon le même schéma : l'échantillon de terre est ensemencé dans un lot de 10 à 12 fioles à la fois, à raison de 5 grammes par fiole contenant « la solution de Winogradsky modifiée », réglée au moyen d'un mélange de phosphate monobasique et de phosphate bibasique à des pH différents, de manière à avoir

une échelle de 10 à 12 échelons, en commençant par 4,5-5,0 pour s'élever jusqu'à 8,0-9,0. Au bout d'une trentaine de jours, on prépare un second lot B de même composition, mais dont les fioles sontensemencées avec les fioles du lot A, échelon par échelon. Suit un lot C et parfois encore un lot D exactement pareils. Au bout d'une trentaine de jours, on exécute le dosage du nitrate formé et on constate que les différents échantillons de terre paraissent nitrifier le mieux à des pH différents; cette prédilection paraît se stabiliser au fur et à mesure des réensemencements. L'échelon qui paraît présenter l'optimum du pH pour un échantillon de terre déterminé est choisi alors pour ensemenecer un nouveau lot complet de 10 à 12 échelons de culture-filles. On y choisit de nouveau les cultures qui ont le mieux travaillé pour répéter l'opération, ce qui conduit en fin de compte à un nombre de lignées ne travaillant qu'entre des limites étroites de pH et devenant peu actives, ou même inactives, en dehors de ces limites.

Le même procédé a été employé pour le microbe de la nitrification et celui de la nitratisation.

De toutes ces très nombreuses expériences il est conclu, qu'il doit exister plusieurs souches ou espèces de microbes de nitrification, caractérisées par ce qu'elles ne sont actives qu'à un pH déterminé, étroitement limité. Pour la nitrification les auteurs croient pouvoir affirmer l'existence d'au moins 3 souches désignées α , β , γ ; mais ils inclinent à en admettre encore 3 autres, dont ils sont moins sûrs. De même pour la nitratisation: les souches a , b , c , d , et encore 3, en plus, moins nettement différenciées par leur pH . Voici le tableau des optima du pH propre à chacune des souches.

Microbes de la nitrification :

α	7,7-7,9
β	6,7-6,8
γ	6,5
?	7,0-7,2
?	9,0
?	6,0

Microbes de la nitratisation :

a	6,5-6,4
b	6,8
c	7,0-7,3
d	8,2-8,4
?	7,6-7,9
?	9,0
?	9,2-9,4

Il y aurait donc en tout, environ 6 souches de nitroso-bac-

téries et environ 7 de nitro-bactéries se différenciant par le caractère fixe d'un pH de prédilection.

On verra dans la suite que la conclusion des auteurs, qui n'est, en somme, qu'une hypothèse, se rapproche sous certains rapports de la réalité; mais il est impossible d'admettre, qu'elle puisse jamais être prouvée par le procédé mis en œuvre, qui ne trouve sa justification, ou sa raison d'être, que dans ce que les auteurs manquaient de méthode pour isoler ces espèces et souches et pour les caractériser *lege artis*.

Le problème sera discuté dans la suite de ce mémoire.

LA DÉTERMINATION DU POUVOIR NITRIFICATEUR DES TERRES. — Ce pouvoir a intéressé les agro-chimistes et les agro-biologistes, surtout comme indice de la fertilité. A ce point de vue, il a provoqué beaucoup de recherches et suscité beaucoup de controverses.

Une analyse complète en a été faite par Waksman [40] dans la série de ses recherches sur l'analyse microbiologique du sol comme indice de la fertilité.

Ce savant, après avoir soumis à la critique les méthodes employées, propose de son côté un procédé qui donnerait d'après son avis, « un tableau complet de la capacité nitrifiante du sol ». Le procédé comprend cinq expériences :

1° Expérience en solution de sels minéraux contenant 30 milligrammes d'azote sous forme de sulfate d'ammoniac, additionnée de craie,ensemencée avec de la terre au taux de 10 p. 100 (ancienne méthode Rémy-Löhnis);

2° Expérience de nitrification dans une portion de 100 grammes de terre passée par un tamis, sans addition;

3° Même expérience, mais avec addition de 30 milligrammes d'azote sous forme de sulfate d'ammoniac;

4° Même expérience, mais en ajoutant aux 100 grammes de sol, en plus du sel ammoniacal, 210 milligrammes de carbonate de chaux; enfin,

5° On mélange à 100 grammes de terre 0 gr. 25 de poudre de sang desséché sans autres addition.

La première expérience ne fournirait que des indications générales sur la présence des agents de la nitrification. La seconde renseignerait sur la capacité de la terre de produire

des nitrates, sur son taux d'azote nitrifiable et sur son état de tamponnement : s'il est suffisant, pour que le phénomène y puisse avoir lieu. La troisième serait spécialement indicative de l'état de tamponnement : les terres mieux pourvues de chaux seront évidemment capables de produire plus de nitrates. La quatrième, où la terre est enrichie de sel ammoniacal et en même temps de chaux, serait l'expérience cruciale, celle qui fait marcher le processus dans les conditions optima et, par conséquent, fournit la meilleure base pour comparer l'intensité de la nitrification dans différents sols, soit avec d'autres processus microbiens dans le même échantillon. Enfin, la cinquième avec une substance protidique au lieu d'un sel ammoniacal tend à reproduire le processus complexe de la nitrification de l'azote organique, qui débute par la pullulation des hétérotrophes, causant un dégagement abondant d'ammoniac, et partant une forte réaction alcaline du milieu.

La durée de toutes ces expériences est d'une trentaine de jours à l'étuve, à l'exception de la cinquième que l'on termine au bout de quinze jours. Toutes finissent par le dosage du nitrate formé, et c'est *la quantité de ce nitrate qui sert de mesure au pouvoir nitrificateur des différents échantillons*. Dans la cinquième on complète ce dosage par celui de l'ammoniac restant.

On voit que le procédé n'a rien de microbiologique et qu'il ne bénéficie des notions microbiologiques acquises que dans l'interprétation. Du reste, on ne lui demandait pas même d'enrichir nos connaissances sur les agents de la nitrification, dont il ne s'occupe guère. Rechercher, si *la production de nitrate* marche d'accord avec la productivité du sol, et si elle peut lui servir d'indice, relève évidemment plutôt de l'Agro-nomie ou de l'Agrochimie, que de la Microbiologie, et c'est sous l'empire de cette idée que l'on estimait le procédé satisfaisant, s'il faisait ressortir une plus-value de nitrate en faveur d'une terre notoirement fertile, ou au contraire non satisfaisant, si les données des rubriques *fertilité* et *nitrification* ne se montraient pas d'accord.

Cet accord paraissait quelquefois se réaliser, notamment dans les expériences de Waksman lui-même ; d'autres fois, il restait douteux, ou même nul. Mais quelles que soient les opinions

sur les résultats immédiats du procédé, la somme de travail nécessaire — soit cinq expériences d'une durée d'un mois, suivies de plusieurs dosages chimiques à la fin — est décidément disproportionnée au résultat, dont la valeur pratique est contestable. Sans nier que la méthode puisse donner quelques indications utiles sur l'état de tamponnement du sol et sur son taux d'azote nitrifiable, elle nous paraît plutôt impuissante à nous renseigner sur la densité et l'activité comparée des nitrificateurs au sein du sol dont dépend son pouvoir nitrificateur.

En effet, si l'on ensemence un microbe quelconque dans un milieu approprié, l'effet biochimique qui lui est propre se déclare, bien entendu, plus rapidement à la suite d'une semence forte que d'une semence faible, mais avec le temps, la marche du processus s'égalise de plus en plus, et on aboutit finalement au même taux du produit final. Le fait se reproduira même en opérant avec des souches différentes, dont l'une moins active que l'autre, à condition qu'on lui donne le temps d'arriver. Aucune comparaison de l'énergie des processus microbiens d'un sol donné n'est donc valable, *si l'on ne met pas le temps dans la comparaison*. Nous y avons déjà insisté à l'occasion de nos expériences sur le pouvoir fixateur des terres, et nous n'avons qu'à rappeler un exemple concret qui est bien de nature à fixer l'opinion sur ce sujet.

Ensemençons deux terres, dont l'une riche en *Azotobacter*, l'autre entièrement dépeuplée, à raison de 1 gramme de terre sur des plaques de silico-gel à 2 grammes de mannite. Sur celles du premier lot, on verra parfois éclore jusqu'à 10.000 colonies, sur celle du second, 1-2. Au bout de quarante-huit heures, les plaques du premier seront presque entièrement recouvertes par de petites colonies, lesquelles se mettront à confluer dans le cours de la troisième journée en formant une nappe continue de mucus; il leur suffira de quatre fois vingt-quatre heures pour consommer les 2 grammes de mannite, et le gain en azote fixé atteindra alors le maximum, soit environ 20 milligrammes. Quant aux plaques du second lot, la colonie unique parue se développera avec une vigueur extraordinaire en couvrant au bout du même délai plusieurs dizaines de centimètres carrés de la surface. En l'analysant en même temps, on constatera qu'une partie seulement de la mannite a disparu, mais qu'il y a déjà

gain assez notable en azote atteignant et dépassant 2 milligrammes. Mais gardons-la encore quatre à cinq jours à l'étuve, et toute différence entre les deux lots sera annulée; on verra la substance énergétique disparaître et le gain en azote fixé atteindre le même maximum.

Ainsi, en comparant les rapports de densité de la population spécifique *au sein du milieu naturel* avec celui du produit des activités *au sein du milieu artificiel*, on voit que le premier est 10.000 à 1, tandis que le second n'est que 10 à 1, mais cela pour une durée d'expérience de quatre jours seulement, une durée plus longue effaçant toute inégalité. Le seul dosage du produit final de la culture artificielle au bout d'un délai quelconque égal pour toutes les expériences comparées, surtout s'il est assez long, peut donc conduire à un résultat entièrement contraire à la réalité.

Si la méthode n'est pas microbiologiquement correcte, en principe, il est pourtant juste de remarquer que la durée adoptée pour les expériences de nitrification ne peut être considérée comme longue, car les cas ne sont pas rares où le processus ne débute qu'au bout de deux à trois semaines après l'ensemencement et même encore plus tard; et c'est ce qui explique le fait observé par Waksman et quelques autres expérimentateurs, que les terres traitées par le fumier de ferme, ou régulièrement chaulées, provoquaient une production de nitrate plus abondante au bout de ce délai que les terres non traitées. Le temps ne suffisait pas, évidemment, pour effacer les différences de densité, et peut-être encore d'activité *dans les cas extrêmes*. Quant aux cas intermédiaires, ils étaient très probablement difficiles à saisir, et c'est là probablement la cause des conclusions contradictoires des différents observateurs.

On a vu, ensuite, qu'une partie des épreuves du procédé entier est conduite en se servant de la terre même comme milieu de culture, ce qui paraissait rapprocher les conditions des épreuves de la nature. Cependant, une petite portion de terre tenue dans un vase, assaisonnée encore de différentes substances à un taux exagéré ne peut être considérée comme identique au milieu naturel : critique déjà exprimée à diverses occasions par Waksman et par d'autres savants. Ce n'est qu'une sorte de milieu artificiel, qui a le défaut de n'être pas synthétique

en présentant, de plus, des conditions physiques, chimiques et biologiques variables d'un cas à l'autre, et échappant au contrôle. S'il s'agit donc d'estimer une activité microbienne qui s'y joue, il est infiniment plus exact d'isoler cette dernière sur un milieu électif en n'utilisant cette terre que comme semence, et de l'étudier ainsi dans tous les cas, sans exception, dans des conditions strictement égales.

En isolant ainsi, d'après ce principe, le processus sur des plaques de silico-gel électif, il devient facile de suivre pas à pas la marche de l'oxydation en notant toutes ses phases, au lieu de se contenter du dosage du produit final; et ceci donne plus de précision aux études comparées de l'activité de différents échantillons.

Cette méthode a été quelque temps en usage à notre laboratoire. Elle a été appliquée assez largement par M^{me} Ziemiecka [41] à l'étude des sols polonais. Les écarts du pouvoir nitrificateur des différents échantillons étaient bien appréciables, mais toujours plutôt dans des cas extrêmes. Du reste, il est évident que cette méthode se heurte à la même objection, nous entendons l'impossibilité de rendre le processus provoqué avec de la terre sur un milieu artificiel responsable de celui qui a lieu dans le milieu sol.

Le rôle qui revient au milieu artificiel — comme nous l'avons déjà indiqué par rapport à la fixation — n'est que de déterminer la densité des germes spécifiques au sein du sol, et il n'y aura qu'à admettre les chiffres des densités trouvées comme proportionnels aux activités. Cette admission — nous le répétons — ne saurait être toujours strictement conforme à la réalité, car on peut se figurer une partie des germes à l'état inactif au sein du milieu naturel, devenu infertile pour eux, mais reprenant sur le milieu artificiel plus propice; tout de même, pullulation et activité chimique étant en général concomitantes, il n'est que logique d'admettre entre elles un rapport plus ou moins constant, autant qu'il s'agit, bien entendu, d'une même fonction. En tout cas, c'est la seule donnée immédiate, libre de toute équivoque, qui peut servir de base à l'estimation comparée d'un pouvoir déterminé du sol.

La tache se ramène ainsi à l'opération, tant pratiquée, du dénombrement des germes, avec la différence, qu'il ne s'agit

pas dans ce cas de germes quelconques, censés pulluler sur un milieu universel, mais de germes à fonction déterminée paraissant sur un milieu électif.

Si l'on se demande, pour quelle raison la méthode de numération, si ancienne comme principe, n'a pas trouvé place parmi les manipulations du procédé compliqué que nous avons mentionné, la réponse est facile : parce que les colonies de ces microbes, mal repérables, ne se prêtent pas à cette pratique. C'est pour cela que l'on a tenté de lui substituer la méthode de dilution, laquelle, plus pratique, n'a jamais pourtant donné de résultats dignes de confiance. Dans notre cas particulièrement, son emploi ne promet rien : il suffit, pour ne citer que les principaux inconvénients et causes d'erreurs, de rappeler l'attente de plusieurs mois qui est nécessaire pour décider si les hautes dilutions ont provoqué la nitrification dans le liquide standard, la réaction nitreuse qui apparaît à la longue sans le concours des microbes, la perte de l'ammoniac sous l'effet de la base carbonatée dans les cultures gardées longtemps à l'étuve, etc. : le résultat en devient nécessairement incertain.

LA NITRIFICATION DANS LES SOLS FORESTIERS. — Son étude approfondie est de date récente. Antérieurement, l'opinion était assez répandue que le sol forestier est dépourvu de microbes nitrificateurs. Ils y sont effectivement plus rares que dans le sol arable et surtout très inégalement répartis. Mais cette répartition, comme l'ont montré les recherches étendues de Hesselman [42] a une importance majeure pour la culture forestière, car le rajeunissement de la forêt dépend en première ligne de la mobilisation de l'azote de la couverture humique, dont la nitrification est le symptôme le plus important, ainsi que l'aboutissement final. On conçoit donc aisément que l'ingénieur forestier soit souvent mis devant la question de savoir quelle est la capacité de nitrification dans telle ou autre partie de la forêt.

Deux méthodes sont recommandées par Hesselman pour ce but : 1° des échantillons d'humus sont gardés à 20° à un état d'humidité convenable sans aucune addition pendant trois mois (*storage test*), 2° de petites quantités d'humus sont ense-

mencées dans le liquide dit de Winogradsky avec du carbonate de magnésie; ou mieux du carbonate de chaux, pour obtenir une réaction moins alcaline (Romell). Au bout de trois mois on dose le nitrate formé dans les deux lots.

Ces épreuves ne peuvent fournir que des données sommaires, essentiellement pour les mêmes raisons que celles que nous avons exposées à propos de la terre arable.

L'ÉPURATION DES EAUX RÉSIDUAIRES. — Dans ce cas également les données sur les agents de la nitrification ont un caractère des plus sommaires. Leur présence a été constatée, comme on l'a vu, plusieurs fois dans les filtres biologiques; on leur a trouvé essentiellement les mêmes caractères qu'aux agents du sol. Mais leur étude n'a plus fait aucun progrès, et on ne possède toujours aucune méthode pour déterminer leur densité dans le milieu, ni leur activité.

Quant aux *boues activées* — milieux où la nitrification atteint une énergie impressionnante — on ignore presque tout de leurs agents actifs. On est allé même jusqu'à douter du rôle des agents bactériens dans ce cas, en invoquant des facteurs purement chimiques.

Tous ces cas attendent une méthode facile et sûre pour leur étude approfondie.

Sur la méthode.

GÉNÉRALITÉS. — En commençant par celle qui a conduit à la découverte des microbes nitrificateurs il y a quarante ans, il est clair qu'elle ne pouvait être que ce qu'elle a été. Une période bien longue de culture élective en solution — ou cultures d'enrichissement, comme on les désigne maintenant — accompagnée d'examen microscopiques et d'analyses chimiques était indispensable pour se faire une idée assez précise de ce que présentaient ces microbes, tant cherchés, comme forme et fonction. Ces caractères préliminaires établis, il fallait les isoler à l'état de pureté irréprochable, opération longue et pénible, à cause d'une longue suite d'échecs qui ont précédé la réussite. Après isolement définitif, leurs propriétés physiologiques attiraient les expériences, dont la chimio-synthèse et

l'intolérance envers les aliments organiques étaient les plus saillantes.

Mais une fois cette caractéristique établie et *confirmée*, on ne voit plus de raison de refaire ce chemin de pionnier, si long et si laborieux. Tout ce que l'on peut dire actuellement de l'ancien procédé, jugé comme une méthode courante, c'est qu'il ne conserve qu'une valeur historique.

Cela d'autant plus que l'évolution des idées amenées par la *méthode directe* permet d'apercevoir très clairement les défauts inhérents à l'ancienne méthode. Comme l'un de nous y a insisté déjà plusieurs fois, les cultures dites d'enrichissement sont non seulement inutiles, quand il s'agit d'isoler du sol quelque microbe spécifique, mais elles vont à l'encontre du but poursuivi. En ce qui concerne spécialement nos microbes, leur densité dans le sol ne dépasse pas souvent un à quelques milliers de germes par gramme de terre, et il n'est pas rare qu'elle descende à quelques centaines. Ces germes sont ainsi dans leur milieu naturel déjà à un degré de dispersion tel qu'une particule de terre visible à l'œil nu peut n'en contenir qu'un seul. Quoi de plus favorable à un isolement, si l'on s'empare de cette particule pour la déposer directement sur un milieu solide électif, où elle donne lieu d'emblée à une pullulation uniforme? Souvent du premier coup cet isolement est pratiquement fait, il ne reste qu'à le contrôler.

Au contraire, si l'on débute en jetant un ou quelques grammes de terre dans un milieu liquide, pour y provoquer une pullulation, avant de procéder à la différenciation, les pullulations seront composées de toutes les espèces qui sont capables de pulluler dans cette solution, en mélange intime avec les impuretés qui accompagnent les microbes spécifiques se nourrissant de leurs restes. En procédant alors à des ensemencements successifs, on n'obtient aucune épuration sérieuse quelque longue que soit la lignée des cultures. Il arrive plutôt que le mélange s'adapte aux conditions, devenant encore plus difficile à dissocier. S'il est alors encore possible d'éliminer les impuretés au moyen d'une technique minutieuse, il est déjà trop malaisé de différencier les souches de même fonction, s'il y en a plusieurs. Le résultat final est que l'on est conduit forcément à comprendre toutes les pullulations que l'on observe

dans le milieu ammoniacal dans une espèce unique de nitroso-bactérie, ainsi que toutes celles que l'on observe dans la solution nitreuse comme espèce unique de nitro-bactérie. Cela est quelquefois vrai, autant qu'il s'agit de la culture, mais non du sol qui l'a mise en train, car il arrive que l'une seulement des souches qu'il contient arrive à pulluler dans la solution en dominant ou en refoulant les autres. Souvent, la conclusion n'est exacte ni par rapport à la culture, ni par rapport à l'échantillon dont elle provient, mais elle ne s'impose que par l'impossibilité d'une séparation. C'est là la raison de ce que l'un de nous, dans ses anciennes recherches, n'a jamais reconnu qu'une seule espèce de nitroso-bactérie et qu'une seule espèce de nitro-bactérie dans les échantillons de terre qui lui ont passé sous les yeux; de même les observateurs qui ont suivi. Et puisque les formes du genre *Nitrosomonas* se distinguent par leurs pullulations plus rapides et par leur activité plus énergique, c'est elles qui ont accaparé l'attention générale. En réalité, comme on le verra dans la suite, le sol d'une même région héberge plusieurs formes de nitrificateurs de chacune des deux fonctions, différemment adaptées aux conditions d'existence que présentent les milieux d'habitat.

Aux moyens du procédé simple que nous allons décrire, on arrive assez rapidement à différencier et à isoler les souches à un état d'épuration pleinement suffisant, sous tous les rapports, pour les expériences sur la nitrification. Aucun « test » spécial n'est nécessaire pour s'en assurer.

Si l'on veut débarrasser les germes spécifiques de toute trace de « mauvaise herbe » bactérienne qui les accompagne, rien n'empêche de pousser les opérations jusqu'à ce que l'épuration *complète* réussisse, ce qui exigera un supplément de manipulation. Enfin, si l'on tient à partir d'un seul germe, il n'y a qu'à recourir à un micromanipulateur, dont celui de Janse-Peterfi est d'un fonctionnement parfait. Comme on l'a vu, Nelson a déjà eu recours à ce procédé en se servant de la technique décrite par Wright et Nakajima (*Journ. of Bact.*, 17, 1929, p. 10-11). Mais, à vrai dire, on ne voit pas bien le but à moins que l'on ne désire éprouver encore une fois — laquelle déjà? — l'influence des substances organiques, ou bien tenter à nouveau de transformer ces autotrophes en hétérotrophes.

Or, cette question n'intéresse nullement le problème de la nitrification *dans la nature*, car il est évident que la variété nouvelle, si on réussit à la créer, ce qui est plus que douteux, par des artifices les plus ingénieux, ne pourra se maintenir que dans des conditions artificielles et qu'elle se perdrait rapidement dans le milieu naturel, sans jamais pouvoir y jouer un rôle.

Passons au détail des manipulations.

PRÉPARATION DES PLAQUES. — La production de substance étant toujours insignifiante et les colonies mal visibles, l'idée était naturelle de se servir de l'effet dissolvant des nitrosobactéries sur des bases carbonatées pour repérer leurs colonies. Le principe de la méthode, quelques indications sommaires sur la manipulation et les résultats qu'elle est susceptible de donner ont déjà été signalés dans deux notes parues en 1929 [43]. Le carbonate de calcium vient en premier lieu, le carbonate léger de magnésie en second; il est avantageux parfois de faire un mélange des deux. Le phosphate ammoniaco-magnésien avec un mélange de carbonate de calcium peut servir au même but; son usage simplifie l'opération, car il supprime l'imprégnation préalable du silico-gel par le sel ammoniacal, mais les colonies y sont plus difficiles à différencier et la masse enchevêtrée des cristaux de phosphate, qui jonche les aires des colonies après dissolution de ce sel double, est de nature à gêner le diagnostic.

Pour les plaques nitritées où il n'y a, bien entendu, aucune corrosion, on se sert principalement de poudre de *kaolin lavé médicinal* dont on verra l'avantage.

Toutes ces substances sont étendues sur la surface des plaques silico-gel sous forme d'enduit absolument uniforme sans trace de grumeaux d'aucune sorte, ce qui demande quelques soins. La surface du gel doit se présenter couverte d'un émail blanc, d'un aspect sec, sans traces d'humidité excessive. Pour manipuler les poudres, on se sert d'ustensiles en porcelaine que l'on flambe avant l'usage. Une provision de ces poudres, stérilisées à l'autoclave, est tenue dans des boîtes en verre, où on les conserve à l'abri des poussières.

La solution saline est composée comme suit :

Phosphate bipotassique.	0,5
Sulfate de magnésie	0,3

Chlorure de sodium.	0,3
Sulfate ferreux	0,02
Sulfate de manganèse.	0,02
Traces de sels de zinc, de molybdène, de titane, d'aluminium.	
Eau distillée, en centimètres cubes.	200

La solution de sulfate d'ammoniac contient 50 milligrammes de sel par centimètre cube. On prend :

Pour une boîte de 10 centimètres
de diamètre 2 cent. cubes de solution saline et 1 cent.
cube de solution ammoniacale.

Pour une boîte de 20 centimètres
de diamètre 10 cent. cubes de solution saline et 5 cent.
cubes de solution ammoniacale.

En ajoutant un minimum d'eau distillée, on fait bouillir dans un petit bœcher, on jette sur la plaque, on évapore la nappe liquide en laissant les boîtes ouvertes sur une plaque métallique chauffée à environ 50°. Ce n'est qu'alors que l'on procède à l'émaillage, séparément, comme précaution pour éviter les pertes en ammoniac, particulièrement dans le cas de la magnésie.

Pour l'émaillage, on prend 1 gramme de carbonate de calcium, ou 0 gr. 5 de carbonate de magnésie par plaque, parfois cette dernière dose additionnée de quelques centigrammes de carbonate de calcium. Pour les grandes plaques, les doses sont quintuplées. On pèse dans une petite capsule, on jette dans un petit mortier, on ajoute un minimum d'eau distillée et on triture très soigneusement la bouillie jusqu'à ce qu'en penchant le mortier de tous les côtés, on ne distingue plus le moindre grumeau dans ce lait. On le verse alors sur la plaque et on soumet à un second séchage.

Si c'est l'ensemencement avec une suspension qui est à l'ordre, on en fait couler 1 cent. cube, ou tant que nécessaire, sur la plaque immédiatement après le lait, et on mélange intimement en imprimant à la plaque un mouvement de rotation. Le second séchage se fait à une température ne dépassant pas 35°. On tâche de réduire autant que possible le temps nécessaire en évitant tout excès d'eau. D'ordinaire, il ne doit prendre beaucoup plus d'une heure. Quand il est fini, on examine bien si l'enduit ne contient encore quelque petite quantité d'eau en excès qui pourrait déranger l'émaillage.

Si l'on veut ensemer par grains de terre, on en dispose sur une plaque de 10 centimètres environ 150 en lignes régulières et à distances égales. S'il s'agit de semer un poids déterminé de terre sur la plaque, on en introduit quelques grammes (on détermine préalablement le taux d'humidité) dans un creuset Gooch que l'on pèse avec sa soucoupe et son couvercle ; puis, en le soulevant avec une pince, ou simplement avec les doigts, on fait tomber, en le frappant de

petits coups, la quantité nécessaire sur toute la surface de la plaque ; un second pesage donnera par différence la quantité semée.

Pour la nitratisation, on prend par plaque de 10 centimètres : 0 gr. 5 de poudre de kaolin, additionné de quelques centigrammes de carbonate de calcium, 2 cent. cubes de solution saline, 1 cent. cube (30 milligrammes) de solution de nitrite de potasse ; pour une plaque de 20 centimètres, les doses sont quintuplées ; on mélange le tout dans une petite fiole, on chauffe jusqu'à ébullition, on jette sur la plaque, on évapore.

La poudre de kaolin, à laquelle on mélange un peu de craie, est ajoutée pour rendre les colonies mieux visibles. Elles le sont beaucoup mieux sur une surface blanche que sur le gel incolore, sous l'aspect de gouttelettes hyalines ou de taches jaunes.

Il est à remarquer une fois pour toutes, que toutes ces opérations ne présentent aucun risque de contamination, l'air étant toujours dépourvu de germes nitrificateurs et les germes banaux étant absolument négligeables dans le cas. Les opérations de stérilisation, particulièrement à l'autoclave, classiques en microbiologie, peuvent donc être de beaucoup réduites sans crainte de brouiller le résultat.

Ajoutons que l'on a tenté plusieurs fois de remplacer le silico-gel par de la gélose. On n'y a jamais bien réussi. La nitritation y avait lieu, à en juger par la réaction, mais avec une extrême lenteur et sans formation de plages de dissolution bien visibles. A cela s'ajoutait la difficulté de les conserver longtemps en bon état, car les mucédinées s'y installaient à la longue.

DIFFÉRENCIATION ET ISOLEMENT DES SOUCHES. EXAMEN MACRO-ET MICROSCOPIQUE. — S'il n'est pas possible de provoquer avec ces organismes la production de colonies voyantes, possédant des textures variées, ces plaques émaillées présentent le précieux avantage, que les végétations des nitroso-bactéries y sont très bien repérées et que l'on n'a besoin d'aucune vérification pour reconnaître leur fonction : seule une nitroso-bactérie est capable de dissoudre une base carbonatée sur un gel minéral, avec un sel ammoniacal comme seule substance énergétique.

Il n'y a donc qu'à piquer les plages de dissolution pour étudier les pullulations et pour les réensemencer.

Quand il s'agit d'isoler une nitroso-bactérie de la terre, on commence toujours par des plaquesensemencées *en grains*, comme ci-dessus indiqué. Il est avantageux de préparer pour chaque échantillon deux plaques, dont l'une émaillée de carbonate de calcium, l'autre de carbonate de magnésie : la différence de réaction a pour effet de faire dominer des souches différentes. Au bout de six à sept jours, si la terre est active, d'une quinzaine, si c'est le contraire, les grains s'entourent de zones translucides, ou le gel par dissolution de l'enduit est mis à nu (voir les figures, 5^e mémoire, ces *Annales*, 48, p. 124-125). On étudie alors à la loupe l'aspect de ces zones, qui peuvent présenter quelques caractères différents, peu marqués, en somme, mais suffisants pour une première différenciation : surface tantôt couverte de mucus hyalin abondant, tantôt sèche, ou chagrinée, ou jonchée de cristaux, ou portant des sortes de petites verrues, etc. ; corrosion incolore ou entourée d'une ligne grisâtre, ou jaunâtre, etc. On repère ainsi un certain nombre de zones et on les soumet à l'étude microscopique.

Pour faire une préparation, on touche la colonie par le bout droit, ou formé en petit crochet, de l'aiguille de platine et on le lave dans une toute petite goutte posée au centre d'une lamelle ; on l'étend ensuite sur un petit rond de 2 à 3 millimètres ; l'étendre plus largement ne serait pas avantageux, car les préparations sont en général assez pauvres. On sèche, on fixe à l'alcool absolu, on brûle rapidement l'excès.

Quant aux colorants, le plus avantageux est de se servir de *violet acide sulfo* en solution à 1 p. 100 dans de l'eau phéniquée à 5 p. 100. Cela tant pour les nitroso-, que pour les nitro-bactéries. D'autres colorants seront indiqués, quand il sera question de caractères morphologiques.

REPIQUAGE DES SOUCHES ET CULTURE PURE. — L'examen microscopique est exécuté en laissant, bien entendu, de côté toute idée de variation, sans parler de la théorie des *life cycles*. Toute colonie, composée de cellules homogènes qui se distinguent bien par leur forme et taille des autres pullulations, est considérée comme une souche autonome, quitte à voir à la

culture ultérieure, si ses caractères se maintiendront constants.

Le repiquage se fait toujours sur les plaques de silico-gel émaillées de carbonate de chaux ou de magnésie, selon le cas. On pique la colonie, on lave dans 10 cent. cubes d'eau de robinet bouillie (première dilution), et on y puise 1 cent. cube pour le laisser couler dans une seconde fiole avec la même quantité

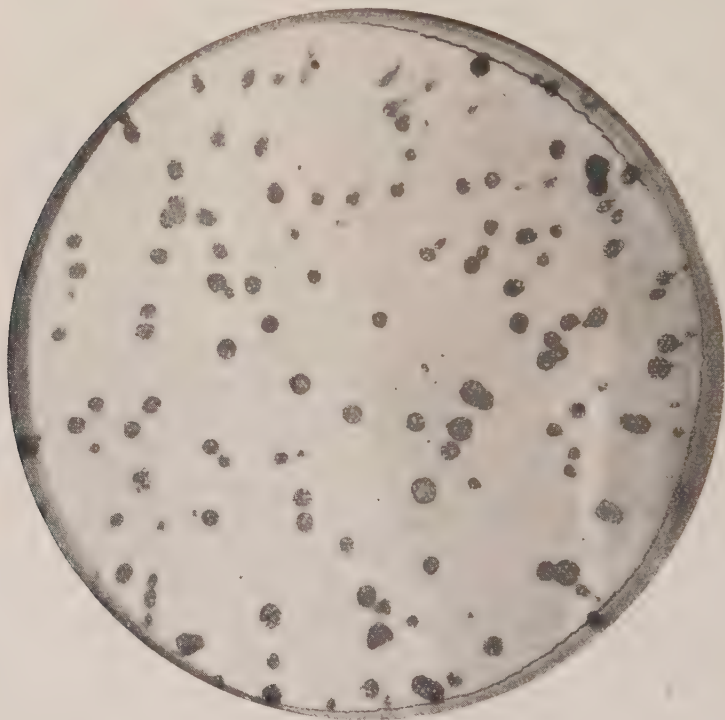


FIG. 1. — Plaque de repiquage de *Nitrosomonas*, souche *a*.
Grandeur naturelle.

d'eau; cette seconde dilution suffit généralement pour raréfier les colonies. Parfois on va tout de même jusqu'à quatre dilutions.

Les plages paraissent au bout de sept à dix jours. Aussitôt qu'elles ont atteint environ 2 millimètres, on les soumet au contrôle microscopique, pour voir si la forme visée s'est développée. Si c'est le cas, on procède sans retard à un second repiquage, car il s'agit d'éliminer les bactéries de la nitratisation.

Cela réussit souvent du premier coup, si l'on ne tarde pas à faire ce repiquage; il en ira autrement, si on laisse la plaque vieillir et disparaître l'ammoniac, lequel prévient la pullulation des nitro-bactéries. En tout cas, l'élimination de ces dernières est toujours facile. Le contrôle chimique renouvelé de temps en temps sur la ou les premières cultures démontrera cette élimination comme un fait accompli, si le nitrite y reste stable indéfiniment.

Pour reconnaître si la culture est pure ou presque, il suffit de soumettre à un examen microscopique soigneux quelques colonies parues. Le tableau doit présenter une homogénéité irréprochable; s'il y a encore quelques « mauvaises herbes » bactériennes, on les reconnaît facilement sous formes de rares bâtonnets minuscules, presque incolores, car ne prenant pas le violet sulfo. Pour avoir une idée de l'importance de la souillure, on examine de préférence la ceinture de la goutte séchée, toujours plus abondamment garnie. Si l'on ne trouve là rien d'étranger, la culture est considérée comme pure; s'il n'y a que des exemplaires isolés, espacés, la culture est tout de même épurée à un degré qui ne présente aucun inconvénient pour les expériences sur la nitrification; on ne verra plus repulluler ces quelques germes étrangers à la suite de nouveaux repiquages, mais plutôt disparaître. Tout de même, on préfère de ne choisir pour les repiquages successifs que les colonies qui méritent la qualification de pures. C'est sur ces dernières que l'on étudie les souches au point de vue de leurs caractères morphologiques et physiologiques.

Pour les maintenir en culture, il est alors plus commode de les réensemencer en disposant sur la surface émaillée au moyen d'une anse de platine un nombre de gouttelettes de la suspension qui s'étendent sans endommager l'enduit (Voir fig. 6 dans le texte p. 408). On garde les plaques après le développement de la végétation à la température de chambre en les empilant, couvercle en bas, dans de grandes boîtes de 25 centimètres de diamètre et 7 centimètres de profondeur, où il y a place pour une douzaine et pour une soucoupe plate remplie d'eau. Le gel se conserve en bon état plusieurs mois et jusqu'à un an. Les nitrificateurs y restent bien viables, et on n'y voit apparaître aucune impureté. Il suffit de repiquer la collection environ

deux fois par an, en ayant soin, bien entendu, de renouveler la provision d'eau dans les grandes boîtes servant de chambres humides.

CONTRÔLE CHIMIQUE. — Si l'on en parle ici, ce n'est que pour rappeler, qu'il peut être très complet tout en étant réduit à sa plus simple expression. Les réactifs extrasensibles — précieux pour le contrôle des eaux potables, comme celui de Peter-Griess — sont à rejeter dans ce cas, car ils empêchent plutôt de suivre la marche de la nitrification en réagissant à des traces qui n'ont rien à faire avec elle. On s'en tient donc au réactif de Trommsdorf, à la diphénylamine sulfurique, à la liqueur de Nessler pour les épreuves qualitatives, et l'on éprouve toujours d'après l'ancienne manière, c'est-à-dire en puisant dans la culture en solution avec une petite anse en platine n'excédant pas $1/50$ de centimètre cube, que l'on plonge dans un godet contenant II à III gouttes du réactif. Les plaques de silico-gel sont éprouvées de la même manière, c'est-à-dire en y découpant un petit grumeau de gel, gros à peine comme un grain de blé que l'on jette dans le réactif. Le grand avantage de ce procédé est que l'on peut suivre pas à pas la marche du processus, même dans des expériences quantitatives, avec une perte de substance tout à fait négligeable. Avec la liqueur de Trommsdorf, 2 milligrammes par litre d'azote nitreux donnent un léger nuage bleu, 6 milligrammes une tache bleue, 18-20 milligrammes, une tache indigo noirâtre. En opérant de même avec la liqueur de Nessler, on a une tache rouille depuis 60 milligrammes d'azote ammoniacal par litre, une tache jaune à 25, un nuage pâle à 10 milligrammes par litre.

Pour le dosage, le titrage avec le permanganate de potasse est la seule méthode indispensable à l'étude de ces microbes. On se sert d'une solution environ N, 10, assez ancienne pour que son titre soit stable : on l'étabit au moyen de la méthode classique à l'oxalate d'ammoniac. On prépare une solution de nitrite de potasse (pur, pour analyses, du commerce), qui soit exactement équivalente à la solution de permanganate de potasse. La solution dont on se servait contenait 0 milligr. 67 d'azote nitreux pour 1 cent. cube. Son titre n'a aucune tendance à se modifier pendant la conservation.

On amène la culture en solution à 100 cent. cubes, on en prend une partie aliquote qu'on laisse couler au moyen d'une pipette dans un volume de permanganate de potasse en excès, additionné d'acide sulfurique. Ce faisant, on tient le bout de la pipette plongée dans le permanganate en réglant avec le doigt un écoulement très lent et en agitant avec ce bout. On titre ensuite avec la solution nitreuse, en tenant toujours le bout de la burette immergée dans le permanganate et en réglant l'écoulement de manière qu'il se fasse de plus en plus lentement, n'excédant pas vers la fin — le liquide devenu rose — 1 goutte par minute jusqu'à décoloration. Les dosages ainsi exécutés sont exacts à moins de 1/10 de centimètre cube près.

Cette seule méthode a servi pour les expériences sur la nitritation ainsi que sur la nitratisation en fonction du pH , que l'on a fait en solution. Pour la nitritation, le rendement sera directement proportionnel au volume de permanganate décoloré, pour la nitratisation ce volume indiquera ce qu'il reste en nitrite non oxydé, la proportionnalité avec le rendement sera donc inverse.

LE PROCESSUS DE NITRIFICATION EN FONCTION DU pH . — La difficulté de cette expérimentation est de composer une gamme de pH assez longue, allant par exemple de 5,0-5,5 à 9,5 et assez stable, pour ne subir aucune modification spontanée, ainsi que pour résister à l'action microbienne.

Gaarder et Hagem ont cru la vaincre en réglant le pH au moyen d'un mélange de phosphates ajouté à des doses graduellement croissantes, de manière à avoir 10 à 12 échelons, comprenant toute la gamme dans les limites susdites. Ils se sont assurés par des expériences préliminaires que les quantités maxima du mélange ne dépriment pas le processus. Tout de même, ils ont bien remarqué que le phénomène, dans ces conditions, est loin d'avoir la vigueur de celui que l'on observe en présence d'une base carbonatée, qui manquait. C'est pour cette raison, probablement, que leurs expériences exigeaient une durée si longue, ce qui est défavorable pour la précision des résultats à cause des changements que subit le pH , partie spontanément, partie sous l'effet de l'acide nitreux produit.

Des expériences préliminaires nous ont montré, de plus, que les optima n'étaient pas si étroitement limités, pour qu'il soit nécessaire d'expérimenter avec 10 à 12 échelons, ce qui complique inutilement le travail.

Six échelons suffisent, à savoir : 1° au-dessous de 6,0 ; 2° de 6,0 à 6,6 ; 3° de 6,8 à 7,2 ; 4° de 7,4 à 7,8 ; 5° de 7,8 à 8,6-8,8 ; 6° de 8,8 à 9,2.

C'est au moyen de bases carbonatées insolubles, avec, en surplus, quelques gouttes d'acide chlorhydrique et de soude, que l'on s'efforcera de régler la gamme de la manière que l'on verra tout à l'heure.

On ne mentionnera que la dernière combinaison qui a été adoptée à la suite de nombreux tâtonnements.

On prépare deux solutions identiques, sauf que la solution I contient du phosphate mono-, la solution II du phosphate bibasique.

Phosphate de potasse (mono- ou bibasique)	0,5
Sulfate de magnésie	0,3
Chlorure de sodium	0,3
Sulfate de fer.	0,02
Sulfate de manganèse	0,02
Eau de robinet.	1 litre.

Au lieu d'eau distillée, on prend de l'eau du robinet, une eau de source, non seulement à cause de son pH plus élevé que celui de l'eau distillée de laboratoire, mais à cause de traces de substances minérales diverses qu'elle contient et qui pourraient favoriser en doses infinitésimales le processus microbien. Les expériences conduites en cultures pures, les traces de substances organiques que cette eau peut contenir ne présentent pas d'inconvénients.

On se sert pour ces expériences de petites fioles coniques à fond plat de 7 centimètres de diamètre. On distribue les carbonates insolubles et on stérilise à l'autoclave, sans charger les fioles de liquide ; précaution nécessaire, car le verre peut rendre à l'eau surchauffée des quantités d'alcali suffisantes pour déterminer une altération du pH dans quelques-unes des fioles. Toute la quantité de solution nécessaire pour le lot entier est stérilisée à part dans un ballon muni d'une pipette de 20 cent. cubes de contenance ; de même, une solution de sulfate d'am-

moniac à 1,5 p. 100, munie d'une pipette de 1 cent. cube. On les distribue à raison de 20 cent. cubes de la solution I ou II et de 1 cent. cube de la solution ammoniacale, soit 15 milligrammes de sulfate d'ammoniac par fiole. Les trois premiers échelons reçoivent la solution I, les trois derniers la solution II. Toutes chargées, les fioles auront en plus :

N° 1. — Marbre 0 gr. 1 en 4 esquilles. Acide chlorhydrique, N/4 VI gouttes, pour obtenir $pH = 5,2$.

N° 2. — Marbre, 0 gr. 5 en 16 esquilles. Acide chlorhydrique, N/4 V gouttes, pour obtenir $pH = 6,0$.

N° 3. — Marbre, 1 gramme en 24 esquilles, pour obtenir $pH = 7,1$.

N° 4. — Poudre de craie, 0 gr. 5, pour obtenir $pH = 7,6$.

N° 5. — Carbonate de magnésie léger, 0 gr. 1, pour obtenir $pH = 8,7$.

N° 6. — Carbonate de [magnésie léger, 0 gr. 3. Poudre de craie, 0 gr. 01. Liqueur de soude, N/1 II gouttes, pour obtenir $pH = 9,2$.

En gardant le lot à blanc à l'étuve durant six jours, on détermine tous les jours le pH par la méthode colorimétrique et l'on constate que :

Dans le n° 1, le pH monte très lentement, se maintenant toujours au-dessus de 6,0, qui n'est atteint que vers le sixième jour.

Dans le n° 2, élévation encore plus lente pour atteindre 6,5 vers le même jour.

Dans le n° 3, élévation insignifiante jusqu'à 7,3.

Dans le n° 4, stabilité.

Dans le n° 5, de même.

Dans le n° 6, rétrogradation sensible, de sorte que pour maintenir le pH à 9,1-9,2 il est nécessaire d'ajouter toutes les vingt-quatre heures II gouttes de liqueur de soude N/1.

En résumé, si une stabilité irréprochable est impossible à obtenir dans ces conditions, les modifications se tiennent dans les limites des échelons prévus.

Un second point est à surveiller, à savoir : les pertes d'ammoniac dans les échelons à pH élevé, n°s 5 et 6. Cette perte peut atteindre jusqu'à 50 p. 100 et au-dessus de la dose ajoutée au bout de six jours à l'étuve. Il n'y a donc qu'à en ajouter de faibles doses, aussitôt que l'épreuve donne un nuage jaune pâle dans le réactif de Nessler.

Malgré ces soins et le tamponnement par les bases en excès, on n'est pas parvenu à prévenir tout glissement du pH vers le côté acide à la suite de la nitritation. Si la magnésie assurait

un pH stable, ce n'était pas toujours le cas pour la craie et ce n'était pas à l'acide carbonique, chassé par l'ébullition avant l'épreuve colorimétrique, que l'on pouvait attribuer le changement constaté. Mais il n'était jamais considérable, et le meilleur moyen de le rendre inoffensif était d'offrir une dose minimum d'ammoniaque, que le processus vigoureux faisait disparaître dans un minimum de temps, soit cinq à six jours.

Enfin, la critique pourrait relever l'inégalité du traitement résultant du fait que les échelons sont tamponnés par des bases différentes ; mais les éléments de la nutrition minérale — calcium, magnésium, soude — étant en excès dans tous les échelons, l'effet des bases insolubles, ainsi que des traces de soude que l'on ajoute, n'est à chercher que dans le pH qu'elles provoquent. Du reste, on verra que le rôle du pH , comme facteur de l'activité des souches, s'accusera très clairement dans toutes les expériences.

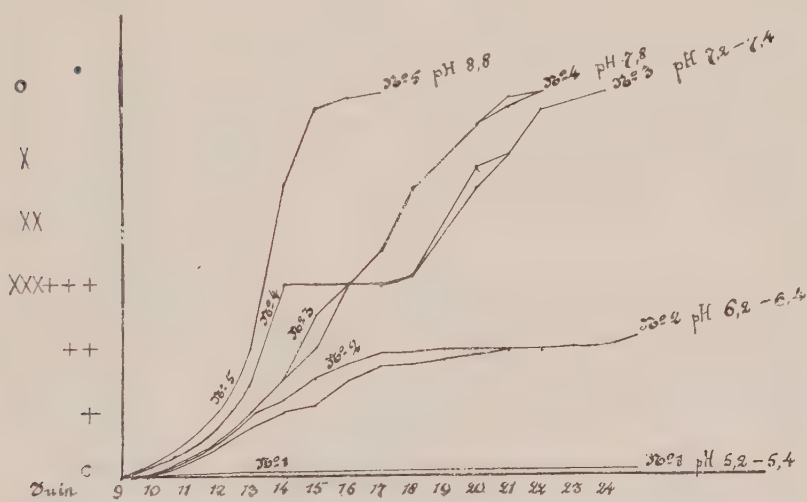
A notre avis, l'avantage que présente notre combinaison est principalement celui que tous les échelons contiennent une base carbonatée, non excepté les échelons au dessous de pH 7,0. C'est la qualité précieuse dans ce cas du marbre de se dissoudre avec une extrême lenteur en tamponnant très légèrement, qui fait que la solution garde son pH peu changé, au dessous de 6,0 et 7,0 pendant plusieurs jours ; et il nous semble que l'on se rapproche de cette manière des conditions d'un sol acide, c'est-à-dire, à dissolution acide, mais qui contient des grains ou débris calcaires difficilement solubles comme le marbre, à cause de leur consistance, leur surface restreinte, soit de leurs propriétés physiques.

Pour ensemercer le lot des fioles, on pique une ou plusieurs colonies sur gel, on lave dans 10 cent. cubes d'eau bouillie et on distribue la suspension à raison de 1 cent. cube par fiole. Au bout de deux jours, on commence le contrôle au moyen de taches colorées. Cette épreuve seule peut donner déjà une idée rapprochée du pH préféré de la souche. On s'habitue facilement à distinguer trois degrés de la réaction Trommsdorff : nuage bleu pâle, signe + ; tache bleue, signe ++ ; tache indigo, signe +++ ; suivent les épreuves de la réaction de Nessler, en décroissance : tache rouille $\times \times \times$, tache

jaune $\times \times$, nuage jaune pâle \times . On trouve ce genre d'expérience qualitative représenté sur le graphique ci-après. Elle se rapporte à *Nitrosomonas*, souche *e* (on en trouvera dans la suite la caractéristique).

La détermination qualitative, si simple et si rapide, pèche par les pertes d'ammoniac que subissent les échelons à *pH* élevé n° 5 et n° 6. La forme des courbes correspondantes n'est donc conforme à la réalité que durant les premiers jours, après quoi elle prend une direction se rapprochant de la verticale à cause du dégagement de l'ammoniac.

L'expérience quantitative est, bien entendu, indispensable.



Graphique 1.

En dosant le nitrite formé au bout d'un délai égal pour tout le lot et en veillant à ce que les numéros élevés ne soient pas dépourvus d'ammoniac durant ce terme, on évite l'erreur qui pourrait résulter de cette perte spontanée. Un graphique très simple symbolise ces expériences. L'axe des abscisses porte les jours; l'ordonnée du jour terminal porte les volumes du permanganate correspondant au nitrite formé par les différentes cultures du lot, désignées par leurs *pH*, voir p. 392.

Il est plus pratique de désigner par 100 le maximum d'effet atteint par la souche en fonction de son *pH* de prédilection et

en pour 100 les taux correspondant aux échelons de pH moins favorables, voire tolérés. C'est à ce mode que l'on se tiendra dans la suite pour caractériser les souches sous ce rapport.

Pour la nitratisation, on désignera par 100 l'activité en fonction de pH qui aboutit à la disparition d'une dose déterminée d'azote nitreux, au bout d'un délai déterminé, égal pour tout



Graphique 2.

le lot. Le dosage de l'azote nitreux dans les autres fioles du lot montrera ce qu'il en reste dans celles-ci, et d'après les quantités obtenues les rapports seront établis en pourcentages comme dans le cas des nitroso-bactéries.

Les résultats étant tout aussi exacts avec des doses faibles qu'avec des doses plus fortes, on gagnera beaucoup de temps dans ce dernier cas en ne dépassant pas la dose de 1 milligramme d'azote nitreux par fiole, ou à peu près.

Le groupe des nitroso-bactéries.

La caractéristique morphologique de ces microbes n'a fait que peu de progrès depuis le mémoire morphologique de 1892.

Rappelons que la première nitroso-bactérie isolée du sol de Suisse et de France possédait une forme ovale, en zéro — forme *Monas* ou *Pseudo-monas* — libre et souvent mobile, munie alors d'un seul cil terminal (voir photogrammes n°s 1-3 ancien mémoire de 1892, et n°s 1-2, pl. III *Lafar's Handbuch*).

Dans les nombreux autres échantillons étudiés, on a retrouvé une nitroso-bactérie qui s'en rapprochait, étant parfois un peu différente par sa taille ou sa forme tantôt arrondie, cocciforme, tantôt plus allongée. Elle apparaissait toujours comme le seul agent de la nitrification de l'échantillon donné, et l'on lui conservait le nom de *Nitrosomonas*. D'autres observateurs ont décrit et figuré sensiblement les mêmes formes et toujours sous le même nom.

En poursuivant les observations et en se servant toujours du milieu liquide, on a noté alors déjà des formes zooglées ou même kystiques, tantôt mélangées intimement aux formes libres, tantôt dominant ou même seules représentées dans le milieu. La marche de la nitrification était nettement moins active dans ces derniers cas.

Il a été impossible avec les moyens qu'on possédait alors de séparer les formes libres des formes zooglées, l'identité de la fonction ne permettant pas une sélection par le milieu dans ce cas. En tentant de le faire au moyen des plaques silico-gel, on ne récoltait toujours que des monades (« colonies claires », du mémoire de 1892) ou rien du tout; ceci parce que les zooglées ou kystes (« colonies sombres »), trop compactes, ne se laissaient pas repiquer.

La forme des cellules, très ressemblante, la fonction pareille, la succession ou alternance apparente des deux formes de végétation dans quelques cultures, enfin, cette impossibilité de les séparer, tout cet ensemble a fait que l'on a été conduit, après bien des hésitations, à considérer toutes ces pullulations comme des stades appartenant à une espèce unique, *Nitrosomonas*. Ajou-

tons, que les monades se présentaient parfois aussi réunies en amas denses qui imitaient les zooglées en voie de dispersion : la différenciation en était d'autant plus difficile.

Au moyen de la nouvelle méthode, cette différenciation ne présente aucune difficulté. On s'assure facilement que les états zoogléliques ou kystiques présentent des caractères assez marqués, pour en faire un second genre de nitroso-bactéries que nous désignons du nom de *Nitrosocystis*.

Enfin, en étudiant divers échantillons de terres, on est tombé plus récemment sur un troisième genre, plus rare, dont l'autonomie a été d'emblée hors de doute : les nitroso-bactéries spirochéliques ou *Nitrospiras*.

Le genre Nitrosomonas. — Forme libre en coccus, en zéro, en bâtonnet à bouts arrondis. La forme et la taille se présentent comme des caractères morphologiques fixes, qui distinguent les souches. Les cellules se détachent après division ou restent réunies en paires, en courtes chaînettes, rarement (chez une des souches) végétation nettement streptococcique. Mobilité sporadique au moyen d'un cil terminal. On voit se former quelquefois des amas denses, mais il n'y a pas de zooglées à proprement parler, car les cellules ne sont jamais liées entre elles au moyen d'une glaire commune, ni la masse entourée d'une capsule commune, comme on le verra chez le genre suivant.

On s'adresse, pour les avoir, à des échantillons de terre de bonne culture, régulièrement fumée, ou encore mieux au terreau de jardin. Sur les plaques, elles apparaissent les premières, en entourant les grains de zones translucides, où le gel est mis à nu. Le repiquage et la reprise sont en général faciles.

Si l'on se met à comparer l'aspect des colonies parues sur plaquesensemencées avec de la terre, on remarque souvent quelques différences de caractères qui incitent à les examiner à part, en comparant le tableau microscopique qu'elles présentent. Ce faisant, on constate que les formes provenant de différentes plages ou colonies sont loin d'être identiques. Ce sont tantôt des cocci vrais, tantôt des formes allongées ovalaires, ou de vrais bâtonnets, de taille assez variable.

Toutes ces formes étant peu différentes entre elles, on inclinerait volontiers, en les examinant en mélange, à les envisager comme appartenant à une seule et même espèce, variant de forme et de taille. Cette conclusion n'est plus soutenable, quand on obtient de différentes colonies des tableaux de pullulations aussi uniformes qu'on pourrait le désirer et nettement différents entre eux : étant de même provenance, parus sur le même milieu, les conditions extérieures n'y sont évidemment pour rien ; on est obligé alors de poser le diagnostic de souches distinctes, quitte à voir ensuite si les caractères morphologiques se maintiendront constants et si — comme il y a lieu de s'y attendre — quelques traits physiologiques différentiels s'associeront à la différence de forme.

De cette manière 5 souches ont été différenciées, dont la caractéristique suit.

Souche a. — Bâtonnet assez trapu de $1,5\ \mu$ à $3\ \mu$ de longueur, environ de $1\ \mu$ 2 d'épaisseur. La division débute quand la longueur maxima de $3\ \mu$, rarement plus, est atteinte. Après division, les deux cellules-filles se gonflent un peu tout en restant réunies, mais elles se détachent bientôt l'une de l'autre, de sorte que l'on ne voit jamais de filaments ou de chaînettes dans les cultures. Séparées, elles s'allongent en bâtonnets à leur tour (v. pl. V, photo. 1).

La souche préfère la craie à la magnésie, ce qui s'accorde avec sa préférence pour un pH pas trop élevé. C'est sur les plaques enduites de craie qu'on l'isole et qu'on la maintient en culture (v. fig. 1 dans le texte p. 384). Ses plages, ou colonies, s'étendent avec une rapidité relative en atteignant sur des plaques à colonies peu nombreuses, au bout d'une quinzaine de jours, 0 cent. 5 à 1 centimètre de diamètre. La surface du gel mis à nu par dissolution de l'enduit a un aspect sec ; on ne distingue aucune production bien apparente de mucus ; en grattant avec une petite anse, on s'assure tout de même que le gel est habillé d'une faible couche de mucus formée par les pullulations du microbe.

Gel et enduit qui entourent les colonies restent incolores. Dans les cultures plus âgées, le gel est jonché de cristaux, ce qui paraît être une des particularités de cette souche dans ces conditions.

D'après le mode de notation admis, son activité en fonction du pH s'exprime ainsi :

A $pH = 7,6$	100
A $pH = 7,2$	62
A $pH = 6,2$	14

Comme un trait à part est à considérer sa tolérance envers un pH au-dessous de 6,0, en présence, bien entendu, de quelques esquilles de marbre. L'activité est alors très ralentie, mais des épreuves assez nombreuses ont montré que des quantités dosables d'azote nitreux se forment régulièrement au bout d'une vingtaine de jours. La quantité n'en dépasse pas quelques dixièmes de milligramme, la majeure partie de la dose d'azote ammoniacal restant inoxydée. Aussi, cette activité si réduite ne pourrait trouver son expression dans le schéma général qui n'embrasse qu'un délai de six jours environ. Cette tolérance envers l'acidité de la solution s'est révélée comme un caractère physiologique constant.

Souche b. — Bâtonnet rappelant la souche précédente, mais de plus petite taille, la longueur ne dépassant pas 2,5 μ , l'épaisseur 1 μ ; cette longueur atteinte, il y a scissiparité. Les cellules-sœurs sont à peine allongées, souvent cocciformes; elles restent parfois réunies en courtes chainettes ne dépassant pas une demi-douzaine d'individus.

Cette souche a été isolée il y a trois ans sur des plaques au carbonate de chaux et entretenue depuis sur ce même milieu.

Ses colonies sur gel se présentent comme un mucus hyalin, incolore, qui couvre le gel mis à nu. Le mucus est assez abondant, jusqu'à remplir la petite excavation formée par la disparition de l'enduit. Ce caractère macroscopique distingue cette souche des souches *a* et *c* auxquelles elle ressemble beaucoup. Une trace de ce mucus étendue sur lamelle donne le tableau microscopique reproduit planche V, phot. 2. Remarquons que les cellules ont une particularité désagréable de mal adhérer à la lamelle, de sorte qu'elles se détachent en partie par l'action de l'eau. On y remédie en étendant sur la goutte séchée une trace de gélose à 1 p. cent.

L'activité en fonction du pH en valeur centésimale s'exprime comme suit ;

A pH 9,1-9,2	100
A pH 8,6-8,0	100
A pH 7,2-7,8	90
A pH 7,0-7,2	69
A pH 6,2-6,6	12
A pH 5,2-6,1	Traces.

On voit d'après ce tableau :

1° Que les limites de la gamme pH sont plus larges que pour l'espèce précédente; en fait, ces limites sont des plus larges entre toutes les souches des Nitrosobactéries étudiées;

2° Que l'optimum tombe sur les deux échelons les plus élevés de la gamme; enfin, qu'il y a tolérance, soit traces d'activité, au sein d'une solution acide, à pH environ 6,0.

Souche c. — Bâtonnet plutôt ténu de 1 μ d'épaisseur, longueur maxima environ 2,5 μ ; léger gonflement des cellules-filles. Tendance à rester réunies en chaînettes courtes, composées au maximum d'une douzaine d'individus (v. pl. V, phot. 3). La souche a été isolée d'un terreau sur enduit de craie et maintenue en culture sur le même milieu.

Les colonies s'étendent à peu près comme celles de la souche précédente, mais elles en diffèrent par ce que le fond de la colonie est recouvert d'un enduit sec, formé de petites granules qui lui donnent un aspect chagriné.

Le tableau de son activité en fonction du pH se présente comme suit :

A pH 8,6-8,8	100
A pH 7,4-7,8	100
A pH 7,0-7,2	75
A pH 6,2-6,6	22
A pH 9,1-9,2	22
A pH 5,2-6,1	Traces.

Cette activité rappelle celle de la souche *b* par les larges limites de la gamme et par ce qu'elle peut se poursuivre sous forme de traces au sein d'une solution acide. Elle en diffère par ce que l'optimum est à 7,4-7,8 et à 8,6-8,8, l'activité tombant rapidement à 9,1-9,2, plus lentement vers le côté acide, et cela avec un pourcentage différent.

Souche d. — Cellules arrondies allongées en ellipse; long diamètre, $2\ \mu$, court diamètre, $1,3\ \mu$ à $1,5\ \mu$ (voir pl. V, phot. 4).

Isolée d'un terreau de couches, paraît très répandue dans les terres bien fumées. Est peut-être identique à la souche isolée l'une des premières il y a une quarantaine d'années d'un échantillon de terre provenant des champs d'épandage de Gennevilliers (voir photogrammes : mémoire 1892, pl. 1, fig. 2 et 3; *Lafar's Handbuch*, pl. III, fig. 2 et 3). Sa motilité sporadique a été alors maintes fois constatée.

Se développe bien sur enduit calcique, est aussi cultivable sur enduit magnésien. Le mucus qui couvre le gel débarrassé de l'enduit est très légèrement jaunâtre, d'aspect mat. L'enduit attenant à la colonie présente souvent une teinte jaunâtre ou grisâtre entourant la zone translucide d'une sorte de frange ou d'auréole.

Le tableau microscopique présente souvent un nombre de cellules en gros coccus gonflées, prenant mal la couleur, évidemment en voie d'autolyse, entremêlées aux cellules normales. On n'a observé rien de pareil chez les autres souches.

Son activité en fonction du pH s'exprime comme suit :

A $pH = 7,4-7,8$	100
A $pH = 8,6-8,8$	45

Inactivité à tous les autres échelons.

Intolérance absolue envers la solution acide à pH 6,0.

Souche e. — Se différencie le mieux des autres souches par ses caractères morphologiques. C'est un vrai coccus d'un diamètre dépassant légèrement $1\ \mu$: $1,1\ \mu$ à $1,2\ \mu$. Sa végétation est nettement streptococcique, les petits cocci restant réunis en chaînettes composées de plusieurs dizaines d'individus (voir pl. V, phot. 5).

On a isolé cette forme du terreau de couches sur plaques de carbonate de magnésie, en y déposant directement les grains de terre. Toutes les colonies parues sur ce milieu appartenaient à cette forme streptococcique, tandis qu'elles manquaient totalement sur les plaques à la craie. Il paraît naturel de mettre ce fait en rapport avec la prédilection de cette souche pour un pH élevé.

Sur l'enduit magnésien, les plages ne sont pas si nettement

dessinées que sur la craie, car cet enduit devient assez largement et diffusément diaphane autour des colonies. Il est facile tout de même de les repérer sous forme de petits affaissements remplis d'un mucus incolore d'aspect gras.

Voici le schéma de son activité en fonction du pH :

A $pH = 8,6-8,8$	100
A $pH = 7,4-7,6$	90
A $pH = 9,1-9,2$	72

L'activité à tous les autres échelons du pH est nulle.

Intolérance absolue envers la solution acide à 6.0.

Le Genre *Nitrosocystis*. — Les états de végétation zooglées ont attiré l'attention dès la découverte des *Nitrosobactéries*. On les trouve décrites en détail et abondamment figurées dans le mémoire morphologique de 1892. Voir surtout les photogrammes 6, 7, 8, 15, particulièrement représentatifs, car les clichés ont été pris sur des préparations faiblement teintées par une solution d'iode, ce qui permet de distinguer très clairement la structure de ces formations, trop facilement masquée par les colorants. On en trouverait difficilement l'équivalent dans les publications qui ont suivi. Ces photogrammes ont été reproduits dans le *Handbuch* de Lafar (voir pl. III, fig. 4, 5, 6, pl. IV, fig. 6), mais ils y ont un peu perdu de leur netteté.

Les zooglées reproduites sur la figure 6 du mémoire 1892 (Lafar, fig. 4) sont jeunes, mais à cet état même ce sont déjà de petites masses arrondies, compactes, composées de cellules allongées cocciformes, pressées sans interstices et entourées d'une capsule commune. Les cinq zooglées assez volumineuses de la figure 8 (Lafar, fig. 5, où il n'y a que trois) sont composées évidemment de plusieurs colonies accotées, à en juger par leur forme bosselée, retenues par la même glaire résistante et entourées également par une enveloppe commune. Mais cette enveloppe y est encore peu développée; elle l'est, par contre, très clairement, jusqu'à former une membrane épaisse double, sur les trois colonies de la figure 15 (Lafar, pl. III, fig. 6) qu'il paraît tout indiqué de désigner d'état kystique, ou simplement de *kystes*.

Ainsi, cette végétation zoogléique était déjà bien connue il y a quarante ans, seulement, il a été trop difficile de faire la discrimination entre elles et de simples amas, communément désignés sous le nom de zooglées, formés par les monades.

La méthode des plaques émaillées donne le moyen de différencier avec sûreté le genre *Nitrosocystis* et de compléter son cycle de développement.

On choisit, quand il s'agit de l'isoler, les zones dont la végétation présente les caractères cherchés, en évitant celles où la présence de monades a été constatée. La séparation réussit souvent du premier coup. Sur ces colonies bien isolées, il est aisé de suivre le développement du microbe dans toutes ses phases. On s'assure alors que les colonies compactes ne restent pas toujours à cet état, mais qu'il arrive un moment, particulièrement à la suite d'un nouveau repiquage, quand elles crèvent, en déversant les cellules plus ou moins libres dans l'ambiance; ce qui est dû probablement au gonflement de la substance gélatineuse qui les retient accolées l'une à l'autre (voir photogramme 9, pl. V). Les cellules de la souche que nous avons isolée d'une terre de Brie et que nous maintenons en culture sur plaque depuis plus de trois ans, présente des cocci d'environ $1,5\ \mu$ de diamètre. On a observé à l'occasion des souches de taille plus faible. Rarement complètement libres, les cellules sont le plus souvent en paires et surtout en petits groupes tétraédriques. Est-ce à une division dans deux à trois directions de l'espace (à l'instar des sarcines) que ce groupement est dû, ou simplement à un déplacement provoqué par la pression exercée par la membrane qui enveloppe le petit groupe, — il est difficile à le dire.

Les cellules libérées sont-elles mobiles? La motilité paraît probable; on l'a anciennement observé en réalité chez une forme provenant d'une terre de Java et qui était sans aucun doute un *Nitrosocystis* (voir le mémoire 1892, photogrammes 9, 10, 11, 12; ou *Lafar's Hanbuch*, planche V, figures 1 et 2; on y voit des tableaux de dispersion et des cocci en paires ou en groupes tétraédriques à l'état mobile, munis d'un cil démesurément long en spirale très régulière).

Avec la souche actuellement en culture, nous ne sommes pas encore tombé sur un état mobile, qui est en général d'une

fugacité qui nécessite un heureux hasard, pour l'observer. Il est à croire, du reste, que la motilité est plus rare sur un milieu solide, où les microbes sont exposés à l'air, que dans un milieu liquide où l'aérotropisme excite les cellules au mouvement vers les couches supérieures.

Tout le cycle se passe donc en commençant par une cellule qui forme une petite zooglée assez régulièrement arrondie, dont nombre se réunissent en s'accrochant et en formant de plus grandes masses. En vieillissant, ces colonies, en tout cas une partie d'entre elles, sécrètent une membrane assez épaisse composée de deux couches dont l'écume prend la coloration, l'intime reste presque incolore.

Ce stade final est reproduit sur le photogramme pl. V, phot. 7. Les kystes y sont particulièrement démonstratifs pour la souche étudiée, que l'on désigne *Nitrosocystis a.* On y voit tout un groupe de kystes accolés ensemble, formant un pâté très caractéristique, qui couvre tout un champ de microscope.

Pour l'isoler et la maintenir en culture, seules les plaques au carbonate de chaux conviennent. Sur magnésie il n'y a aucun développement, probablement à cause de la réaction trop alcaline. Sur le phosphate ammoniac-magnésien la pullulation paraît assez lente et difficile.

Les caractères macroscopiques se distinguent assez nettement de ceux des monades. Le début d'une colonie est marqué par une tache jaune sur l'enduit, suivie d'une dissolution; l'enduit disparu, on distingue sur le gel mis à nu, assez justement au centre de la zone claire, un petit corps arrondi ou angulaire brunâtre qui est la zooglée du *Nitrosocystis*; l'action dissolvante paraît rayonner autour d'elles assez symétriquement, car la zone qui l'entoure est libre de tout mucus, soit de microbes qui ont leur siège dans l'ombilic central. Ce dernier est souvent bien visible sans loupe, car il peut atteindre 0 mm. 5 de diamètre et au delà. Les figures 2 et 3 pp. 402-403 dues au professeur Romell (voir plus bas), illustrent très bien ces caractères macroscopiques.

Pour l'examen microscopique, on a soin d'emprunter la matière à ces corps centraux. Comme colorant on prend de l'érythrosine à 1 p. 100 phéniquée à 5 p. 100, qui ne surcolore pas et qui différencie bien les capsules communes de la masse

cellulaire. Pour se faire une idée de la structure de cette masse et de la forme des cellules, il est recommandable d'examiner la préparation séchée dans une goutte de liquide de Lugol faible.

Ce groupe est-il aussi répandu que les *Nitrosomonades*, et quels sont les habitats qu'il préfère?

Les recherches de notre confrère et ami le professeur Romell qui est venu en 1928 étudier à notre laboratoire des sols des forêts de Suède ont jeté une vive lumière sur cette question [44].

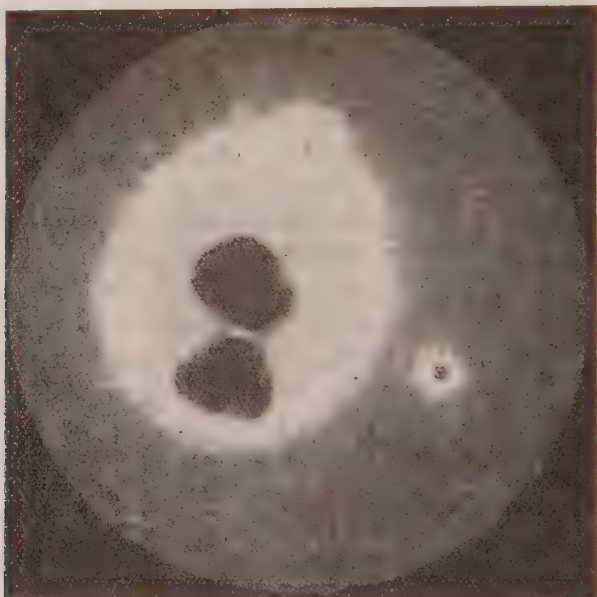


FIG. 2. — Plages de dissolution de *Nitrosocystis*, 10 x. Cliché dû au prof. Romell.

Jusqu'alors, aucune donnée précise n'a été apportée sur les agents de la nitrification des sols forestiers. On se contentait simplement de différencier les échantillons capables de provoquer la nitrification, ou de la subir, de ceux qui ne l'étaient pas, sans se soucier, ou sans parvenir, à en isoler les agents.

Dès les premières expériences, ce savant constate que l'allure du processus provoqué par les sols forestiers — quand ils en sont capables — diffère sensiblement par sa lenteur des sols arables : l'incubation en était longue et l'énergie bien inférieure. Il a dû ensuite renoncer à l'emploi du carbonate de

magnésie et s'en tenir exclusivement à la craie; un résultat positif était alors plus fréquent.

Les cultures en solution selon l'ancien procédé ne laissaient rien voir. Mais l'emploi des plaques émaillées avec du phosphate ammoniaco-magnésien a assez rapidement conduit au but. Ensemencées avec de la terre ou de l'humus forestier, elles ont laissé voir des corpuscules très réfringents situés au centre de zones claires; ces corpuscules étaient des zooglées, ou

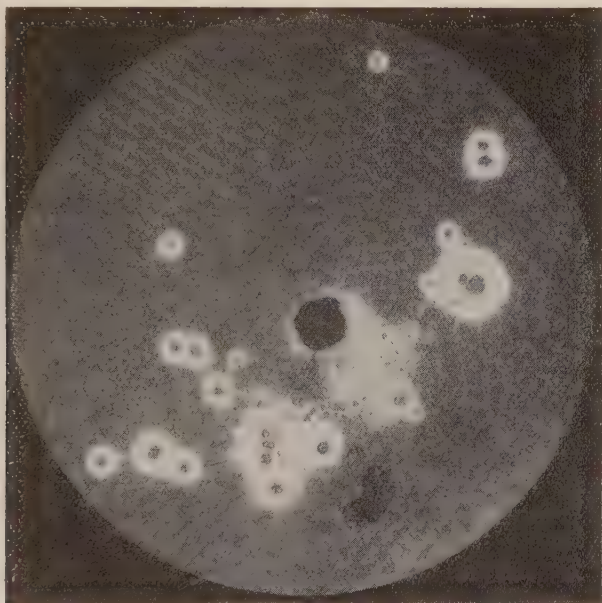


FIG. 3. — Plages de dissolution de *Nitrosocystis*, 10 x. Cliché dû au prof. Romell.

kystes, semblables à celles que nous venons de décrire, sauf leur volume impressionnant et leurs granulations plus fines, qui fait conclure à des cellules microbiennes plus petites (voir les photogrammes de Romell, pl. V, fig. 8, 10, 11). Fait curieux, les monades étaient régulièrement absentes.

Ces recherches, reprises sur des sols forestiers américains au moyen de la même méthode [45], Romell y vit apparaître les mêmes zones de dissolution dont des masses arrondies occupaient le centre. Le microbe paraissait semblable au microbe suédois, avec peut-être une tendance exagérée de produire des

corps bulbeux qui atteignaient 1 millimètre de diamètre. Sur la figure 4, ci-après, empruntée au second travail du même auteur [45], on voit toute une collection de ces corps bulbeux à un grossissement de 200.

Déjà dans le mémoire de 1892, on avait noté la compacité des « petites colonies sombres » parues sur le gel, qui s'y enfonçaient sans changer de forme quand on tentait de les repiquer. Romell, en manipulant les grandes, s'est encore mieux assuré de leur consistance dure. Quand on les pique,

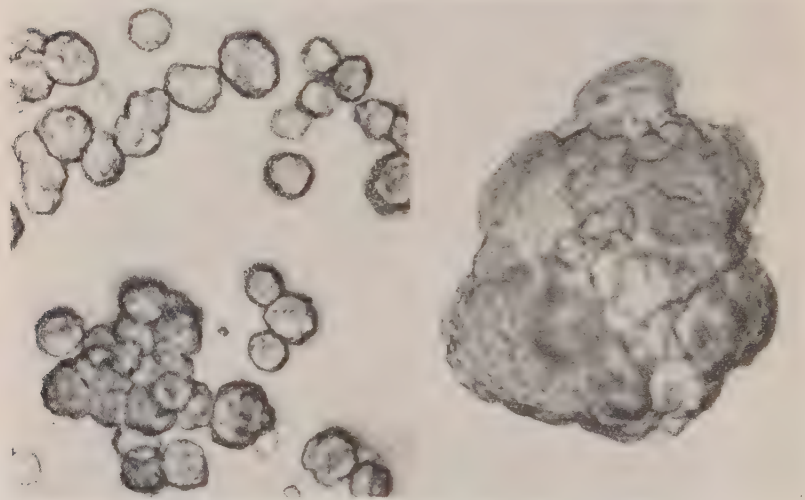


FIG. 4. — Corps bulbeux du *Niroscystis forestier* : 200 x. Cliché de Romell.

dit-il, avec une aiguille d'acier bien acérée, c'est comme si on poussait un grain de sable. Pour les transpercer avec une aiguille de quartz, il faut que le bout en soit non seulement étiré en cheveux mais court et rigide, sans quoi il dévie sans y pénétrer. Si on réussit enfin à les enfiler, il est possible de les rincer dans de l'eau et de les déposer sur une lame sans qu'elles changent de forme. Pour les écraser, une pression considérable est nécessaire ; si l'on y parvient, la masse se transforme en débris irréguliers, sans que les cellules qui les composent deviennent libres (Voir fig. 5, p. 405).

La preuve de leur consistance dure ne laisse donc rien à désirer, et il nous semble que cette qualité rare parmi les bac-

téries justifierait un nom spécial pour ces productions. Ce seraient des *Sclerotium bacteriens*, analogues aux *Sclerotium* des champignons, dont on connaît tant d'exemples. Quant aux petits corps arrondis protégés par une membrane double, on leur réserverait la dénomination de *kystes*. Il est probable que ces derniers sont des états de repos, tandis que l'activité des premières ne présente pas de doute, les zones de dissolution qui s'étendent autour d'eux en apportant la démonstration. Il

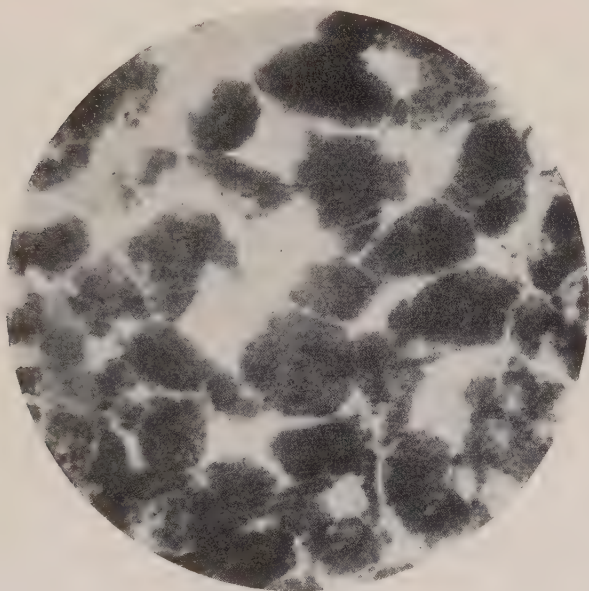


FIG. 5. — *Sclerotium* écrasé : 1.000 x. Cliché de Romell.

est à admettre pourtant que la dispersion de ces produits est marquée par une activité accrue, et que cette dispersion a lieu dans des conditions qui permettent ce relèvement d'activité. Il est clair, d'autre part, que si les *Sclerotium* ne sont pas des états de repos à proprement parler, leur rôle dans la conservation de l'espèce est évident envers des facteurs tels que sécheresse, acidité de l'humus forestier, repos trop prolongé sous la futaie, animaux humivores, etc.

Les anciennes observations sur des terres euro réennes et

exotiques, ainsi que les observations récentes, ont donc démontré à quel point le groupe est ubiquitaire. Les souches en sont probablement nombreuses. Mais les observations de Romell laissent conclure que les sols forestiers sont exclusivement réservés au *Nitrosocystis*, tandis que les Monades y sont totalement absentes. Le fait est important, au point de vue des facteurs qui régissent la répartition des microbes nitrificateurs dans leurs habitats naturels. On y reviendra dans le dernier chapitre de ce mémoire.

Le Genre *Nitrosospira*. — On n'a pas eu le loisir d'étudier beaucoup d'échantillons de terres incultes, les terres cultivées attirant plus l'attention. La première fois que l'on s'y est mis, c'était un échantillon provenant d'un vieux pré en partie couvert de mousse, enclavé dans le parc de l'Institut Pasteur de Brie, qui a été soumis à l'épreuve. Sur la première plaqueensemencée avec de la terre une quinzaine de plages de dissolution ont parues dont une produite par une monade, une autre par un *Nitrosocystis*, le reste par un microbe spiralé, dont l'apparition dans ce rôle nous a été bien inattendu (Voir pl. VI, phot. 12-18).

Un second échantillon provenait de très loin, car il a été recueilli en septembre 1929 par le professeur Issatchenko dans le voisinage de *Matotchkine Char*, sur l'île *Novaya Semlia*, à l'occasion d'une expédition dans les régions antarctiques de la Russie. C'était une terre composée de fin gravier schisteux qui portait quelques végétations de plantes sauvages. On n'a pas touché à l'échantillon jusqu'à mars 1931, quand on a fait passer quelques grammes par un tamis flambé, pour en prélever 1 gramme qu'on a répandu sur une grande plaque (20 centimètres de diamètre) au carbonate de chaux. Au bout de deux semaines, une plagé y parut, et le gel accusa une réaction nitreuse intense. A l'examen microscopique on y reconnut une forme spiralée pareille à celle de Brie. Lentement, d'autres plages ont suivi, de sorte qu'au bout de deux mois il y en avait jusqu'à 25, toutes appartenant à la même forme spiralée. Pas de *Nitrosomonades*, ni de *Nitrosocystis*. La plaque subit une nitritation complète suivie d'une nitratation non moins complète.

Cette chance que nous avons eue d'isoler cette spirochète deux

fois de suite, et cela d'échantillons de provenance énormément éloignée, pourrait faire croire que l'espèce est très commune dans le sol inculte. Il est prématuré de l'affirmer ; remarquons seulement que nous n'avons pas été si heureux une seconde fois en réétudiant un échantillon provenant du même pré, mais prélevé à un point différent.

Depuis, les deux souches, isolées au cours du même mois, sont maintenues en culture au laboratoire sous les désignations de *Nitrosospira Brie* et *Nitrosospira antarctica*. Leurs caractères sont si rapprochés qu'il y a raison de les comprendre dans une seule et même espèce.

Ces caractères morphologiques ne sont pas banaux. Au premier coup d'œil, le tableau apparaît composé de filaments et bâtonnets d'épaisseur égale, mais de longueur très différente jusqu'à des individus presque cocciformes. On s'assure bientôt, qu'il s'agit en réalité de petits cylindres faits d'un filament extra-fin, enroulé en spirale très régulière, de manière que les tours se touchent, — vrai ressort à boudin. En agissant avec de l'érythrosine phéniquée, en lavant avec de l'eau, en traitant ensuite avec du gentiane aqueux durant quelques secondes, on obtient des préparations très claires. Des cas comme celui de la phot. 14, pl. VI où l'un de ces ressorts est étiré par quelque hasard en une spirale d'une parfaite régularité, ne laissent aucun doute sur la nature spirochétique de l'espèce.

En cherchant sa place dans le système, on trouve qu'elle se rapproche du genre *Leptospira* de Hideyo Nogouchi [46] que cet auteur caractérise comme suit : « ... *a long, slender, cylindrical, highly flexible filament with tightly set regular shallow spirals. In some forms the curves are so closely set, that the distance between two spirals is too small to be measured...* » Ce caractère convient parfaitement comme on le voit, mais il s'en trouve d'autres qui ne conviennent pas, à savoir : « ... *both extremities gradually taper to sharply drawn points... the terminal portions of both extremities... may be bent to a hook or stretched out; the hooked end portions are characteristic of the species...* » Ces derniers caractères n'ont jamais été observés.

Mais suivons tout le cycle de végétation de nos *Nitrosospires*. Remarquons qu'elles ne sont isolables et cultivables que sur le carbonate de chaux et qu'elles refusent de pulluler sur

l'enduit magnésien ou le sel double. Les plages de dissolution se font attendre beaucoup plus longtemps que dans les cas précédents. Elles restent plus petites, particulièrement les aires de réensemencement au moyen de gouttelettes de suspension qui paraissent criblées d'innombrables petits trous tardant à s'unir en une plage plus étendue (voir fig. 6 ci-après). Si l'on fait une préparation en grattant le gel mis à nu, qui est d'aspect

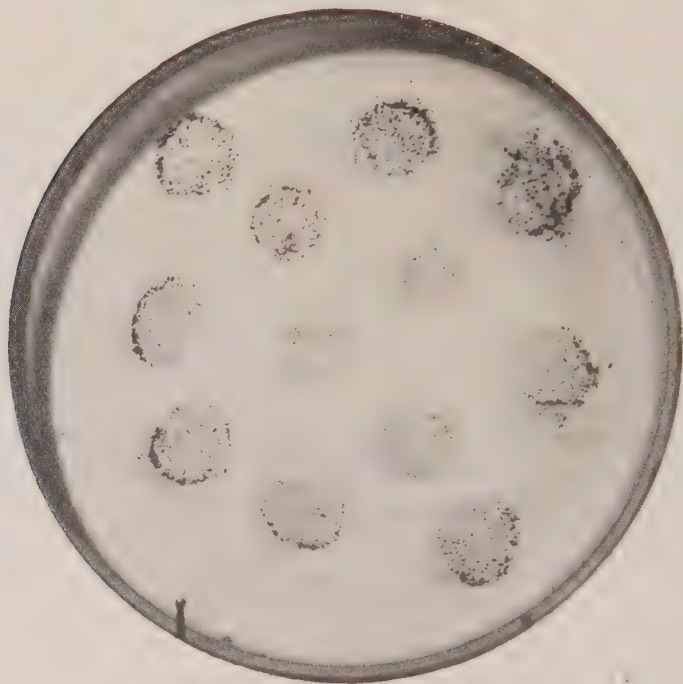


FIG. 6. — Culture sur plaque ensemencée avec des gouttelettes séparées d'une suspension de *Nitrospira antarctica*. Grandeur naturelle.

sec couvert d'une trace de mucus jaunâtre, on a le plus de chances de trouver des spirales bien formées. Elles apparaissent plus longues jusqu'à atteindre 15 à 20 μ chez la souche antarctique, ainsi que rigides et serrées au maximum (pl. VI, phot. 13), tandis que chez la souche locale on trouve parfois des formes spiralées plus desserrées et flexueuses, d'aspect spirochétique plus banal (voir pl. VI, phot. 15).

Les filaments en ressort ne dominant pourtant que rarement

dans le tableau ; les courts bâtonnets et les productions cocci-formes y sont toujours présentes en quantité notable. La structure spiralée y est beaucoup moins apparente ; elle n'est même plus visible chez les productions cocciformes. Ces pseudo-cocci se distinguent des cocci ordinaires par leurs contours flous qui s'expliquent précisément par ce que ce ne sont pas des cocci munis de membrane propre, mais de courts fragments de spirales, des boucles à tours si serrés que l'on ne distingue plus la structure. Dans les cultures âgées, on ne trouve parfois plus rien que des pseudo-cocci, et on ne dirait jamais qu'ils appartiennent au cycle des spirochètes (Voir pl. VI, phot. 17).

Probablement par l'effet de conditions encore incontrôlables,

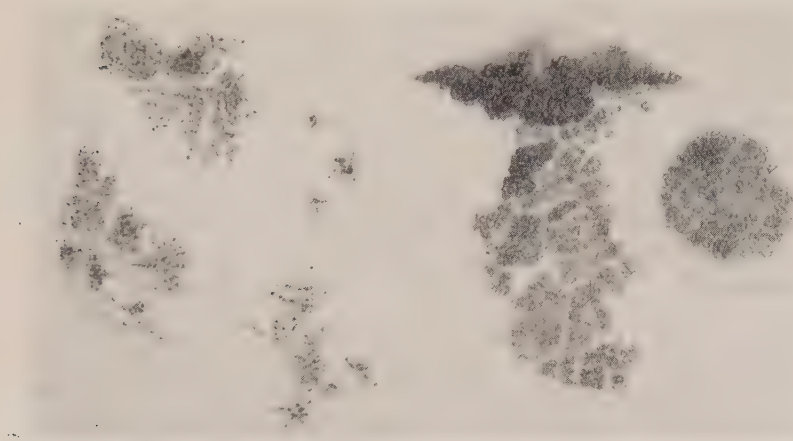


FIG. 7. — Croquis d'après nature de végétation zoogléique et de l'état granuleux de *Nitrosospira* : 1.000 x.

ce cycle se complique encore par l'apparition de végétations zoogléiques (Voir pl. VI, phot. 16), ce que l'on peut reconnaître au seul aspect des plages de dissolution. Dans ce cas, on distingue au centre de la plage un petit amas de substance, un ombilic central qui rappelle le cas du *Nitrosocystis*. Seulement, la masse y est de consistance pâteuse. Un examen soigneux n'y montre que de courts fragments ou pelotons, où la structure en spirale est à peine possible à déchiffrer. Ce qui est inattendu, c'est que ces masses zoogléiques ont une structure propre, que l'on trouve même des états kystiques du même caractère que

chez les *Nitrosocystis*, mais beaucoup moins développés (Voir aussi fig. 7 dans le texte, p. 409). Tout de même, il est à penser que ces états ont un rôle en qualité de formes de repos ou de conservation de l'espèce.

Ajoutons que dans les cultures âgées, déjà nitrifiées depuis plusieurs semaines, on ne retrouve dans le mucus des plages, ainsi que dans les zooglyphes, rien de plus que des granules presque ultra-microscopiques, disposées en chapelets minuscules (Voir fig. 7, p. 409). C'est le stade granulaire, connu chez d'autres spirochètes et probablement filtrable. Le repiquage permet d'obtenir des cultures typiques, mais il est difficile de dire, si la repullulation est due aux granules ou à quelques restes de spirales ou pseudo-cocci.

Le groupe des Nitrobactéries.

Comme il a été mentionné, on ne connaissait jusqu'ici qu'un seul représentant de ce groupe, le *Nitrobacter* qui s'est imposé à tous les chercheurs, comme étant le plus actif; tout comme dans le cas du Nitroso-groupe. En appliquant la méthode actuelle, on s'assure qu'il n'est pas la seule espèce douée de cette fonction et qu'il existe d'autres organismes qui en sont plus ou moins capables.

L'étude de ce groupe prend beaucoup de temps à cause du développement lent qui leur est propre. Et c'est ce qui explique que l'étude en est beaucoup moins avancée que celle du groupe précédent.

Le meilleur procédé pour les isoler sur plaques nitrifiées et koalinées est décrit p. 381-382. L'émaillage avec du kaolin, qui donne une surface blanche ou crème, brillante et homogène comme de la porcelaine, facilite beaucoup leur repérage, qui serait malaisé, tant les caractères macroscopiques des cultures sont peu voyants. Pour les distinguer, il est nécessaire de provoquer une pullulation assez abondante en ajoutant des doses importantes de nitrite — 50 à 100 milligrammes de nitrite de potasse (pur pour analyses) par petite plaque; autrement, les plaques apparaissent désertes, malgré une nitrification constatée par l'épreuve chimique. Mais s'il ne s'agit que

de contrôler le pouvoir de nitratisation des espèces isolées, il vaut mieux se tenir aux doses minima telles que 0,5 à 1,0 milligr. d'azote nitreux par plaque, ou par fiole chargée de 20 cent. cubes de solution ; autrement, l'attente du résultat sera trop longue. Une gouttelette de solution, ou un minuscule grumeau du gel, donnant toujours une tache bleu intense dans la liqueur de Trommsdorf aussi longtemps qu'il y a des traces de nitrite inoxydé, la fin de la nitratisation est toujours très bien marquée.

Le genre *Nitrobacter*. — Il apparaît sur les plaques nitritées, ensemencées de particules de terre, sous l'aspect de zones ou taches jaunes muqueuses. On le repique en préparant plusieurs dilutions. Les végétations sur les plaques abondamment ensemencées ne sont visibles que comme des taches jaunes sur l'enduit. Quand les pullulations sont concentrées sur quelques points peu nombreux, elles se forment en rosée, ou en gouttelettes bombées de mucus hyalin, jaunâtre, très caractéristiques pour ce microbe sur ce milieu, qui peuvent atteindre 1 à 2 millimètres de diamètre. En colorant quelques minutes avec du violet sulfo, on trouve le tableau homogène et pur, qui est reproduit sur la planche V, phot. 6. Ce violet est un colorant de choix pour ce microbe, qui est difficilement colorable avec les colorants basiques usités.

C'est un tout petit bâtonnet long de 1 μ , ou un peu plus, sur environ 0,5 μ d'épaisseur. Mais si on l'examine de près, on lui trouve un aspect assez caractéristique que l'on retient : le contour en est triangulaire, en coin, et la partie acuminée forme une sorte de petit bec plus faiblement colorable que le reste. On s'assure que, si le tableau microscopique porte aussi un grand nombre d'individus simplement allongés ou même arrondis, ce n'est que parce que ces petits coins se présentent en biais ou debout.

En somme, on peut dire que, malgré la pauvreté de sa caractéristique, l'isolement et le diagnostic de l'espèce sont faciles et sûrs. L'emploi de plaques nitritées de hautes dilutions (troisième et quatrième) permettra d'en obtenir une, ou on ne trouvera qu'une demi-douzaine de gouttes hyalines jaunâtres, dont l'apparition sur ce milieu et l'aspect suffiront déjà pour établir

le diagnostic, aisément confirmé par l'examen microscopique.

D'après les anciennes observations, l'espèce est cultivable sur la gélose nitrifiée (voir formule *Lafar's Handburch*, p. 170). Nous préférons l'emploi du silico-gel nitrifié, milieu plus favorable pour les nitrificateurs et dont les propriétés de sélection écartent plus complètement la souillure avec des germes banaux.

Ajoutons qu'en étudiant différents échantillons de sol, on est tombé sur un microbe qui lui ressemblait par ses cellules en coin, mais qui formait des *kystes* à l'instar de *Nitrosocystis*. Malheureusement, la culture de ce microbe que l'on a dénommé *Nitrocystis* a été bientôt perdue. Il y aurait à rechercher, ne serait-il pas l'agent de nitratisation spécialement adapté aux sols forestiers, comme c'est le cas pour le *Nitrosocystis*: recherches recommandées à ceux qui étudient spécialement ces sols.

L'étude des *pH* de prédilection de cette nitrobactérie comme, en général, de tout le groupe, n'a pu être qu'à peine ébauchée. Elle a été faite exactement dans les mêmes conditions qu'avec le groupe précédent, en remplaçant, bien entendu, l'ammoniac par le nitrite. Les échelons de la gamme ont exactement la même valeur du *pH*.

La dose de nitrite ajouté équivalait à 2 cent. cubes de permanganate; elle était donc de 1 milligr. 34 d'azote nitreux par fiole (v. p. 386).

On éprouvait la réaction de Trommsdorf tous les jours à la même heure. L'expérience était interrompue aussitôt que cette réaction tombait à zéro dans l'un quelconque des échelons; tout le lot était alors soumis au titrage.

Pour exprimer les rapports des activités en fonctions du *pH*, on désignait les échelons complètement nitratés par 100 et on déterminait le pourcentage des autres en déduisant le résidu non nitraté.

Exemple : 6 échelons; durée de l'expérience, six jours.

	RESTE TITRABLE	NITRATÉ	ACTIVITÉ
N ^o 1	2,0	0	0
N ^o 2	1,0	1,0	50
N ^o 3	0	2,0	100
N ^o 4	1,44	0,66	33
N ^o 5	1,66	0,44	22
N ^o 6	1,37	0,63	31

Ces expériences ayant donné un résultat sensiblement pareil, il est permis d'admettre que le pH de prédilection de l'espèce est de 7,2 — 7,4 ; que l'activité, diminuée de moitié, peut encore s'exercer un peu au-dessous de 7,0 ; que cette activité décroît plus rapidement vers le côté alcalin, tout en restant encore sensible à un $pH = 9,2$. En somme, les limites de l'activité de l'espèce en fonction du pH paraissent plutôt larges.

Les voiles. — Nous réunissons sous cette dénomination, toute provisoire, des bactéries presque inconnues, mais dont la présence dans le sol a été maintes fois signalée par ceux qui pratiquaient l'examen microscopique direct. (Voir le premier mémoire de ces études, ces *Annales*, 39, 1925, p. 339, fig. 21 ; les observations de Rossi [48], de Cholodny [49], qui ont suivi). Le fait qu'on les y trouve si facilement indique qu'elles y sont très répandues ; mais on ne possède encore aucune donnée sur leurs fonctions.

Or, ces voiles se développent avec régularité sur les plaques nitrées en y formant parfois les seules végétations visibles. Cette apparition est tardive : ce n'est qu'au bout de plusieurs semaines que l'on voit les grains de terre sur les vieilles plaques s'entourer d'une pellicule qui s'étend très lentement en couvrant peu à peu la majeure partie ou la surface entière de la plaque. Le repiquage et l'épuration sont faciles, seulement, il faut se résigner à un développement excessivement lent, ce qui ne favorise pas leur étude.

Nous avons isolé quatre formes dont deux appartiennent à un genre de bâtonnets qui pullulent exclusivement en voile cohérent : ce caractère nous le fera dénommer *Bactoderma*, nom qui fait pendant à l'ancien terme de *Mycoderma*.

Les deux autres appartiennent à un genre de minuscules coccobactéries qui forment de légers voiles non cohérents ; nous les désignerons du nom *Microderma*.

La question se posait, s'il ne valait pas mieux remettre leur caractéristique à un travail ultérieur, mais on a pensé que ce retard équivaldrait à passer ici sous silence des végétations microbiennes d'une apparition non seulement fréquente, mais banale sur les milieux nitrés.

Il paraissait donc obligatoire d'en présenter une caractéristique morphologique succincte et de résoudre la question de savoir, s'ils sont capables de nitratisation, ou s'ils y jouent quelque rôle.

Bactoderma alba. — Ses pullulations ont l'aspect d'une membrane blanche qui s'étend en formant des lobes légèrement irisés, tandis que les parties plus âgées deviennent veloutées ou comme pulvérulentes. Ceci s'explique par le plissement que subissent ces parties qui s'élèvent en produisant des excroissances d'un dessin tourmenté. Mais, uni ou plissé, le voile est toujours composé d'une seule couche de bâtonnets très fins, accolés parallèlement l'un à l'autre et retenus dans cette position par une substance intercellulaire résistante. Le tout se présente comme une sorte de pseudo-tissu, extrêmement délicat, impressionnant par la régularité et l'élégance de sa structure (pl. VI, phot. 21) Ce tissu est plus ou moins déchiré par la préparation, mais toujours on y trouve des lambeaux intacts et assez étendus pour couvrir plusieurs champs du microscope. En petites quantités, les bâtonnets s'en détachent, dont la mesure est de 1,5 à 3,0 μ sur environ 0,3 μ (même fotogr.). Avec les colorants acides, le violet sulfo ou l'érythrosine phéniquée l'action de ce dernier renforcé, après lavage, par une action instantanée de gentiane aqueux faible), on a les meilleures préparations. Seuls, les bâtonnets se colorent, quant à la substance que nous avons qualifiée d'intercellulaire, elle ne prend pas la coloration. Elle remplit les interstices entre les corps des bactéries qui sont, comme on voit bien sur le photogramme, plus marqués entre leurs bouts qu'entre leurs côtés. Cette substance paraît parfois sujette à gonflement sous l'action de l'eau; particulièrement, si l'on détache une particule du voile sur sa partie veloutée et si on la dépose dans une goutte d'eau, on voit le grumeau s'étendre d'un coup en couvrant la goutte d'une très délicate pellicule.

La faculté de nitratisation chez cette espèce est beaucoup moins intense que chez le *Nitrobacter*. Elle est tout de même certaine. Nous l'avons observé tant sur le silico-gel nitrité que dans la solution.

En fonction du pH, elle se présente comme l'indique l'expé-

rience typique qui suit, et qui a été exécutée dans des conditions identiques aux précédentes.

Durée également six jours.

	RESTE TITRABLE	NITRATÉ	ACTIVITÉ
N° 1	2,0	0	0
N° 2	0,22	1,78	89
N° 3	1,53	0,45	22,5
N° 4	0	2,0	100
N° 5	0	2,0	100
N° 6	0,27	1,73	86,5

Malgré l'irrégularité de la courbe, dont nous ne trouvons pas encore d'explication, les expériences paraissent indiquer que cette espèce préfère un μH plus élevé, soit 7,8 à 8,6, que l'espèce précédente.

Bacteroderma rosea. — Cette seconde souche ou espèce est tout aussi fréquente que la première. Elle s'en distingue par sa couleur rose pâle. La structure de la membrane est la même. Seulement les bâtonnets qui composent le pseudo-tissu sont nettement plus courts et plus trapus (voir pl. VI, fotogr. 22).

Dans quelques expériences sur plaques, on lui a trouvé un pouvoir de nitratisation, qui était pourtant faible et inconstant.

Mais dans la solution nitritée on n'a jamais obtenu aucune oxydation, de sorte que son rôle de microbe nitrifiant reste sujet à des doutes.

Microderma minutissima. — Cette forme produit des voiles encore plus délicats, qui ne sont visibles que comme un dessin mat sur la surface brillante de la plaque kaolinée. C'est un microbe minuscule, dont la forme et la taille sont assez semblables aux spores d'un fin bacille filamenteux, tel que *B. subtilis*. Ces petites cellules prennent bien le violet sulfo à leurs périphéries, l'intérieur restant toujours plus faiblement teinté. Dans les préparations elles sont groupées en chapelets ramifiés assez caractéristiques (voir pl. VI, fotogr. 19).

Quant au pouvoir de nitratisation, la même remarque est valable que pour l'espèce précédente.

Microderma vacuolata. — Cette espèce ou souche se distingue de la première par sa forme allongée en bâtonnets minuscules, qui ne se colorent qu'à leurs bouts et sur leurs contours; le reste se présente comme une vacuole allongée, qui apparaît

comme un vide occupant la majeure partie du bâtonnet minuscule; v. pl. VI, phot. 20. Quelque intense que soit la coloration des bouts et des contours, cette soit-disant vacuole reste toujours complètement incolore. Malgré la petitesse du microbe, il est facilement reconnaissable sur les plaques par ce caractère si marqué.

Dans ce cas aussi, l'espèce est très banale sur les milieux à nitrite, mais la fonction nitratante n'apparaît ni assez prononcée, ni constante.

Une remarque générale se rapporte à tous ces voiles : c'est que leur énergétique ne paraît pas conforme à celle des microbes nitrificateurs proprement dits, même dans le cas où la capacité de nitratisation n'est pas douteuse. On constate notamment que ces voiles s'étendent non seulement sur des milieux à nitrite, mais tout aussi bien sur un milieu à nitrate, ne contenant donc aucune trace d'azote oxydable. Leur énergétique reste donc actuellement une énigme, qui est encore à élucider.

Discussion.

Toutes les souches que nous venons de décrire, ont été maintenues en culture, nous le répétons, durant deux à trois ans, — les spirochètes seuls un an et demi, — de sorte que l'on a eu le temps de s'assurer de la constance de tous leurs caractères — y compris les plus secondaires en apparence — dans les conditions données qui leur sont normales, comme on a raison de croire, ou qui s'en approchent en tout cas.

Ce résultat est à noter en vue des données des partisans de la théorie des *life cycles*, qui arrivent à des résultats contraires en employant des moyens plus ou moins violents, aptes à ébranler la constitution de l'espèce.

Il n'en reste pas moins vrai, que toute espèce bactérienne adaptée à certaines conditions d'existence y refait son petit cycle de formes, toujours les mêmes, en ne variant qu'autour d'une certaine moyenne, sous l'influence de quelques écarts dans ces conditions.

A la différenciation morphologique correspond la différenciation physiologique, qui trouve son expression dans ce que

l'activité des souches s'exerce à des concentrations différentes des ions hydrogènes. Le tableau ci-après réunit toutes les données touchant à ce point. Le maximum d'activité qui correspond à l'échelon optimum est désigné par 100 ; les activités réduites, qui correspondent aux échelons moins favorables, en taux pour 100 de l'activité maximum.

pH	5,2-6,1	6,2-6,6	7,0-7,2	7,4-7,8	8,6-8 8	9,1-9,2
<i>Nitrosomonas</i> , souche <i>a</i> .	Traces.	14	62	100	0	0
<i>Nitrosomonas</i> , souche <i>b</i> .	Traces.	12	69	90	100	100
<i>Nitrosomonas</i> , souche <i>c</i> .	Traces.	22	75	100	100	22
<i>Nitrosomonas</i> , souche <i>d</i> .	0	0	0	100	15	0
<i>Nitrosomonas</i> , souche <i>e</i> .	0	0	0	90	100	72
<i>Nitrosocystis</i>	0	0	40	100	11	0
<i>Nitrosospira</i> Brie	0	Traces.	100	66	Traces.	Traces.
<i>Nitrosospira antarctica</i> .	0	Traces.	100	82	Traces.	Traces.

Comme on le voit, l'activité commune de toutes ces souches des Nitrosobactéries étudiées s'étend environ de pH 6,0 à pH 9,2. Il en est qui préfèrent un pH élevé de 8,6 à 9,2 (*Nitrosomonas*, souches *b*, *c*, *e*). Il en est d'autres qui sont actives à un pH moyen, environ à 7,4-7,8 : c'est paraît-il, la majorité, les *Nitrosomonas* *a*, *d* et les *Nitrosocystis*. Il en est, enfin, qui s'accommodent le mieux d'un pH 7,0-7,2 : les *Nitrosospires*.

Ce n'est pas seulement par leurs zones de prédilection que les souches diffèrent, mais aussi par leur taux d'activité à des échelons moins favorables et enfin par leur tolérance envers la solution acide.

On remarquera que cette tolérance est rare, que les souches qui la possèdent n'y travaillent qu'à une allure très ralentie. Quant à un pH nettement au-dessous de 6,0, on n'a pas trouvé de souches qui puissent être actives à cette réaction. On distingue encore quelque activité au sein d'une solution à pH un peu au-dessous de 6,0 mais non plus bas.

La question de la nitrification dans un milieu plus acide, comme on l'a maintes fois signalé, n'est pas pourtant si obscure qu'elle pourrait paraître à la suite de cette constatation négative. En effet, si le processus marche, quoique faiblement, dans notre solution à pH 6,0, ce n'est qu'à cause de la présence de quelques esquilles de marbre, dont la faible surface et la

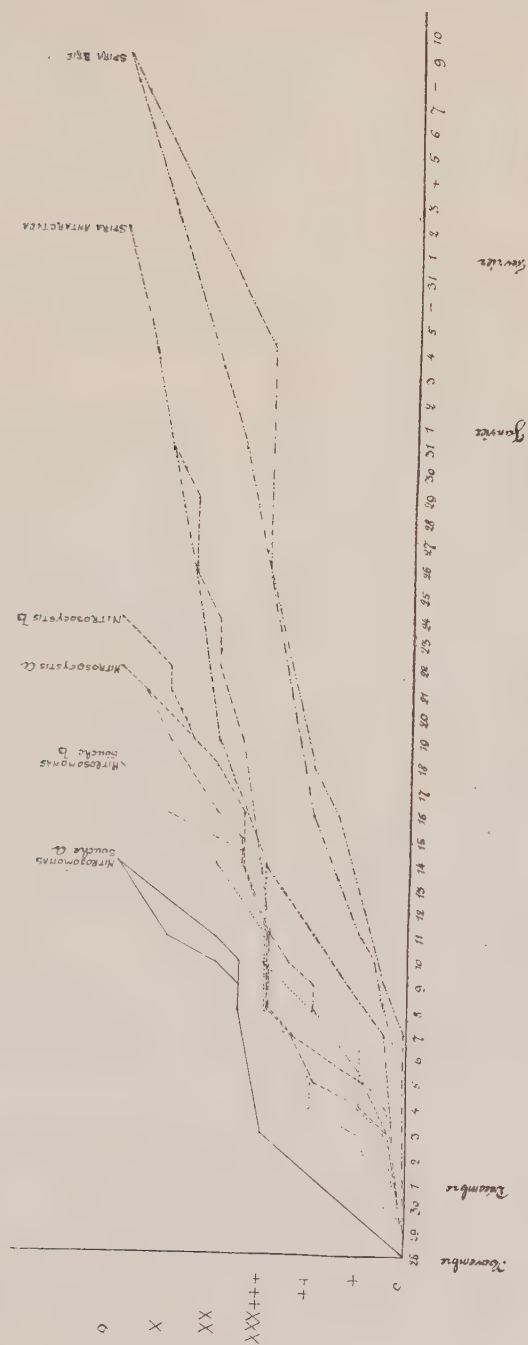
faible solubilité ne modifient pas sensiblement le pH , ou très lentement, tout en présentant un support pour les bactéries actives; car on conçoit que, logées sur le marbre, en contact immédiat avec la base, la cellule peut en retirer directement les cations nécessaires, sans s'adresser à la solution ambiante. Ceci est démontré par le fait que, dépourvue de ces petites esquilles, la solution à un pH de 6,0 ne donne jamais de nitrite.

On se figure donc aisément que le phénomène puisse marcher au sein du sol dans des sortes de nids entourant des particules de calcaire, protégées d'une manière ou d'une autre de la dissolution du sol, quelque acide qu'elle se montre à la détermination globale. Cela d'autant plus facilement, qu'un milieu poreux, hétérogène, n'est pas comparable au point de vue de la facilité de diffusion à une culture en solution. Romell a observé récemment la nitrification au sein d'un humus forestier dont le pH était descendu à 3,0, ce qui le conduit à douter que l'acidité de la solution puisse jamais être envisagée comme un facteur d'inhibition dans le sol [45].

Du reste, il y a raison de croire que, dans un milieu de cette acidité, l'acide nitreux devenu libre se perdrait facilement, sans passer à l'état d'acide nitrique; le fait même que le nitrate s'y accumule, plus ou moins, parle déjà en faveur de ce que les points mêmes de l'activité ne subissent pas l'action de la dissolution acide, et que les ions NO_2 ont le temps de s'y transformer en nitrate, ce qui a lieu, comme on le sait, sans répit dans le sol.

Cette explication a été avancée déjà depuis des années en dehors de toute étude microbiologique, particulièrement par Hall, Miller et Gimingham [35], et on n'en voit pas d'autre. Il paraît, que l'on n'a en tout cas aucune chance de trouver des souches de nitrificateurs spécialement adaptées à des réactions acides.

Cette prédilection pour un pH déterminé est-elle un caractère stable, ou plus ou moins facilement modifiable par l'effet de l'adaptation ou de l'accoutumance? Tout ce que nous pouvons affirmer actuellement, c'est que ce caractère n'a pas varié dans le cours de nos études. Malgré les modifications multiples apportées dans nos solutions dans le but de réaliser la gamme de pH ,



Graphique 3. Marche de la nitrification dans trois lots de fientes, ensencées avec les trois genres de nitrosobactéries.

toujours on retrouvait à peu près les mêmes points optima et les mêmes taux d'activité chez toutes les souches étudiées. Nous ne pouvons donc que conclure que ce caractère est stable dans les limites des conditions de nos expériences.

Caractère individuel des souches, cette activité en fonction du pH apparaît également comme un caractère générique. Ainsi, on voit que les Nitrosomonades possèdent une gamme de pH assez étendue surtout du côté alcalin, tandis qu'elle apparaît très limitée chez les deux autres genres. Il y a là certainement une condition qui détermine la répartition des genres des Nitrosobactéries dans leurs habitats naturels.

A ce caractère générique est à joindre un second, qui est l'énergie différente d'action : elle doit conduire à des exigences différentes en azote nitrifiable. A ce point de vue, les Nitrosomonades viennent les premières suivies par *Nitrosocystis* ; et quant aux Nitrospires, la lenteur de leur action est un de leurs caractères saillants. Dans quelques conditions que l'on compare ces activités, la succession est toujours la même. Pour illustrer ces relations, un exemple concret reproduit sur le graphique de la page 419 suffira.

L'expérience a porté sur trois lots de fioles contenant de la solution tamponnée avec de la craie, additionnée d'une faible dose de sulfate d'ammoniac, toutes conditions égales. Le premier lot a étéensemencé avec les Nitrosomonades *a* et *b*, le second avec *Nitrosocystis*, deux souches, le troisième avec Nitrospires, deux souches. Les épreuves n'ont été que qualitatives, ce qui suffit dans ce cas. Le terme final est la disparition de la réaction de Nessler.

On voit que ce sont surtout les Spirochètes qui sont en retard, en demandant environ deux fois plus de temps pour l'oxydation d'une dose égale d'azote ammoniacal ; mais le retard des *Nitrosocystis* est aussi manifeste.

En considérant ces besoins différents en azote ammoniacal, on conçoit que le régime azoté du milieu est un facteur de premier plan dans la répartition de ces genres dans la nature. D'ailleurs « vorace », les Nitrosomonades envahissent sans concurrence possible les milieux les mieux fournis en cet azote. L'approvisionnement devenu trop limité occasionnera facilement des états d'inactivité, d'inanition, qui les fera à la longue

disparaître, d'autant plus sûrement que l'on ne leur connaît pas de stade de conservation résistant. D'activité plus ralentie, les *Nitrosocystis* pourront se maintenir dans des milieux à un régime azoté moins abondant, en restant si nécessaire à l'état de repos pour un temps très long. Enfin, les Nitrosospires sont capable de s'accommoder d'un milieu excessivement pauvre en azote ammoniacal qu'elles consomment à une allure des plus lentes.

En conséquence, les Monades peuplent, à l'exclusion de toute autre forme, les terreaux, les filtres biologiques, les boues actives, etc. ; elles dominent dans les terres cultivées régulièrement fumées.

Les *Nitrosocystis* apparaissent dans les terres cultivées plus pauvres, dans les terres de pré et surtout, d'après Romell, le sol forestier est leur habitat favori, à l'exclusion de tout autre genre.

Enfin, les Nitrosospires n'ont été trouvées jusqu'ici que dans deux échantillons de terre inculte.

Un troisième facteur de répartition est encore à considérer, qui touche à la tolérance de l'espèce envers les substances organiques dans le sol. La question se pose particulièrement par rapport à l'humus forestier, dont les espèces peuvent contenir des matières insuffisamment dégradées, mal tolérées par les nitrificateurs. Une adaptation à ces substances, ou une tolérance plus grande envers elles, pourrait alors expliquer le fait que seuls les *Nitrosocystis* habitent les sols forestiers. Romell pense que le rôle des animaux y pourrait être aussi pour quelque chose, car il est douteux que les protozoaires puissent dévorer les *Sclerotium* ; il se demande, si mêmes les vers sont capables de les digérer.

Ces résultats écologiques auront une certaine importance pour l'étude du pouvoir nitrificateur des terres, qui pourra se baser, non seulement sur les densités des agents bactériens spécifiques, mais encore sur leur caractère, qui répond de leur activité ; particulièrement, la richesse en monades sera un indice assez sûr d'un régime azoté actif, d'autant plus, si ce sont les souches *b*, *c*, *e*, qui sont adaptées comme nous le savons à un *pH* élevé.

Un examen microscopique qui déterminera la *qualité* des

pullulations pourra donc utilement se joindre à la détermination du nombre.

DÉTERMINATION DU POUVOIR NITRIFICATEUR. — Le procédé, comme il a été déjà indiqué, ne vise que les microbes de la nitrification qui sont tenus répondre du phénomène entier. En effet, à

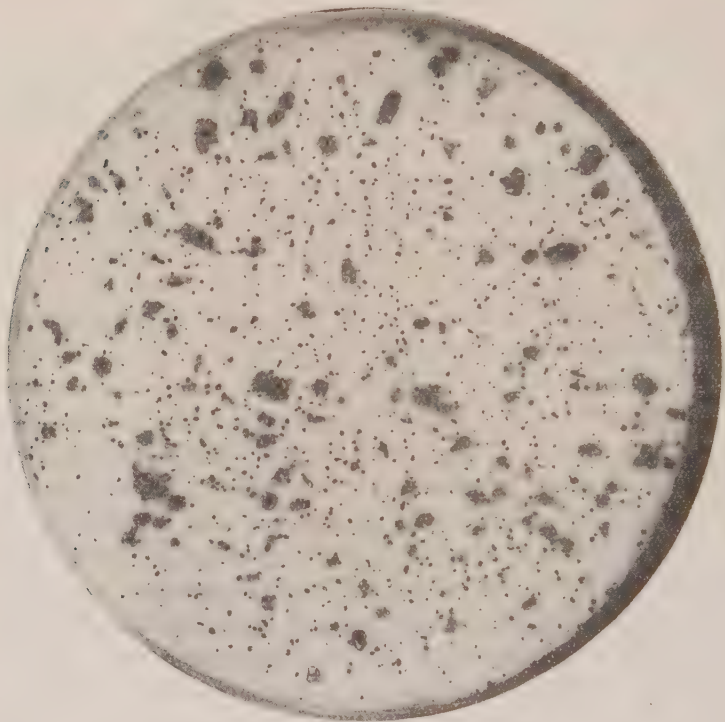


FIG. 8. — Petite plaque âgée de quatre jours ensemencée avec du terreau de jardin. Grandeur naturelle.

l'encontre des idées qui paraissent encore en cours, c'est la nitrification qui prime le phénomène, tant au point de vue physico-chimique (libération de l'énergie, taux d'oxygène entré en combinaison, etc.) qu'au point de vue microbiologique. La nitrification n'est qu'une sorte d'annexe, de complément nécessaire et assuré de la première phase. Aussi, le fait que les microbes de la nitrification sont très malaisés à repérer, et leur densité

impossible à évaluer, n'empêchera pas le procédé de fournir des résultats d'une exactitude suffisante pour le but proposé.

Pour montrer que les dénombrements des plages effectués sur les mêmes échantillons de sol à des époques différentes donnent des chiffres de même ordre, si l'on maintient inchangé le régime de la terre, citons comme exemple une suite d'expériences comparées sur deux échantillons, dont l'un *Esp.* (Espalier) est une bonne terre cultivée, l'autre *Tém.* (Témoin), provient d'une parcelle du même potager maintenue une suite d'années en jachère noire, sans aucune culture, soit une terre inanitiée.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Deux lots de quatre plaques émaillées de craie, dont l'un reçoit 0 gr. 02 de terre *Esp.* par plaque, l'autre 0 gr. 02 de terre *Tém.* par plaque. Au bout de quinze jours dénombrement des plages parues :

<i>Esp.</i> 1.	45
<i>Esp.</i> 2	55
<i>Esp.</i> 3.	43
<i>Esp.</i> 4.	39

Soit en moyenne 45 par plaque ou 2.250 pour 1 gramme.

<i>Tem.</i> 1	8
<i>Tem.</i> 2	4
<i>Tem.</i> 3	5
<i>Tem.</i> 4	4

Soit en moyenne 5 par plaque ou 250 pour 1 gramme.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Deux lots à deux plaques ensemencées par 0 gr. 02 de terre *Esp.* et *Tém.*

<i>Esp.</i> 1.	61
<i>Esp.</i> 2.	42

Soit en moyenne 51 par plaque ou 2.550 pour 1 gramme.

<i>Tem.</i> 1	4
<i>Tem.</i> 2	7

Soit en moyenne 5 à 6 par plaque ou 250-300 pour 1 gramme.

Enfin, dans une troisième expérience exécutée à une époque toute différente, on a utilisé des grandes plaques que l'on ensemait avec des doses plus importantes de terre. Les résultats ne diffèrent pas sensiblement des résultats précédents, à savoir, pour 1 gramme :

<i>Esp.</i> 1	2.185
<i>Esp.</i> 2	2.362
<i>Esp.</i> 3	2.630
<i>Esp.</i> 4	2.270

<i>Tem. 1.</i>	515
<i>Tem. 2.</i>	630
<i>Tem. 3.</i>	440
<i>Tem. 4.</i>	520

On voit que les écarts entre deux parcelles du même potager soumises à des régimes différents sont assez sensibles, pour

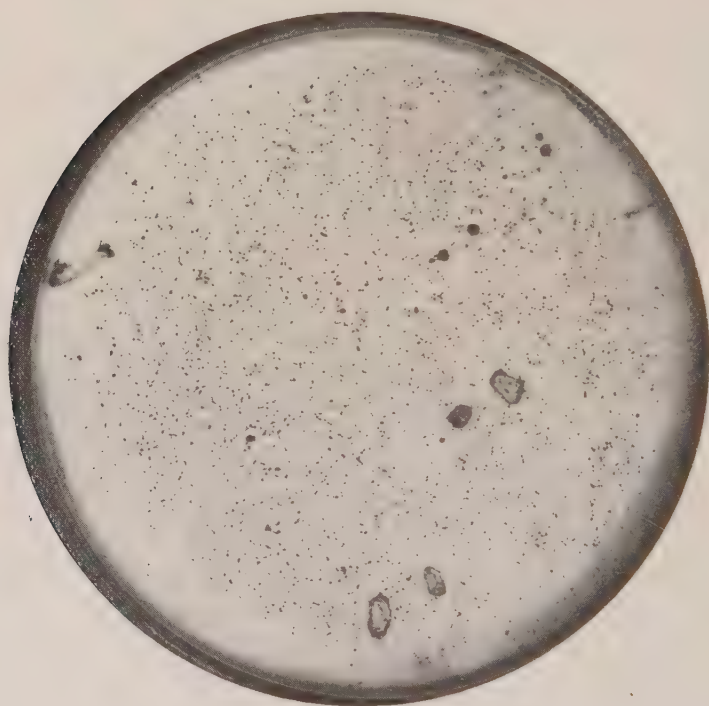


FIG. 9. — Grande plaqueensemencée avec terre *Tem.*.
Environ moitié grandeur naturelle.

qu'une détermination de l'erreur moyenne du procédé ne soit pas indispensable.

Du reste, le seul aspect des plaquesensemencées avec une dose égale des deux échantillons est des plus démonstratif sous le rapport de l'écart dans leur pouvoir nitrificateur (Voir fig. 9 ci dessus et 11, p. 427).

Voici encore quelques dénombrements exécutés sur des

échantillons prélevés dans l'enclos de l'Institut Pasteur, à Brie :

Terreau de jardinier 1	22.000	par gramme.
Terreau de jardinier 2	24.000	—
Parcelle sans fumure.	1.400	—
Vieux pré couvert de mousse.	700	—

Ces nombres ne représentent pas évidemment le nombre des cellules, mais ceux des *centres de nitrification*, qui peuvent être produits par des Nitrosomonades ou des zooglées des *Nitrosocystis* notamment, qu'il est impossible de dissocier par des moyens mécaniques en cellules libres.

Malgré cela, la méthode est assez sensible et sûre pour illustrer toutes les gradations du pouvoir nitrificateur exprimées en chiffres de densité, et cela au bout d'un délai relativement court. Il suffit de quatre à cinq jours pour qu'une plaqueensemencée avec une dose infinitésimale de terreau se couvre d'une multitude de plages (voir fig. 8, p. 422). D'un autre côté, si les nitrificateurs sont réduits à néant, comme c'est souvent le cas dans les sols forestiers, la plaque reste déserte indéfiniment, car aucun microbe étranger à la nitrification n'est capable de simuler l'aspect des plages produites par les nitrosobactéries (voir fig. 10, p. 426).

Il est clair, que dans des cas où il s'agit de différences moins profondes, soit quand une détermination plus exacte est désirable, on rend le procédé plus sensible en ensemençant les plaques non avec de la terre en nature, mais avec des suspensions de plus en plus étendues, selon la méthode classique. Une détermination préalable de l'erreur moyenne donnera, bien entendu, encore plus de précision aux résultats. Mais nous croyons que sous cette forme simple et pratique le procédé pourra déjà rendre de bons services.

Par rapport aux épreuves visant spécialement le sol forestier (voir p. 376), le *storage test*, qui indique non seulement la présence des agents spécifiques, mais encore la *nitrifiabilité* de telle ou autre espèce d'humus forestier, trouvera toujours sa justification. Mais l'épreuve, soi-disant classique, en solution, pourra être très avantageusement remplacée par l'épreuve des plaques émaillées au carbonate de calcium, qui donne le moyen

de déterminer directement, au bout d'un délai de quelques semaines, la densité des nitrificateurs des échantillons donnés. Ajoutons que l'interprétation des chiffres obtenus gagnerait beaucoup si on les comparait avec ceux d'un échantillon choisi comme *standard*. Il est clair aussi que toute facilité est



FIG. 10. — Grande plaqueensemencée avec 1 gramme d'un échantillon de sol forestier, maintenue à l'étuve pendant deux mois: échantillon entièrement dépourvu de nitrificateurs. Moitié de grandeur naturelle.

donnée par le procédé pour faire le diagnostic des agents actifs, qui ont si longtemps gardé leur incognito.

Une dernière conclusion est à tirer des chiffres mentionnés, c'est que les chiffres que l'on trouve dans des ouvrages divers, de l'ordre de 10.000 ou 100.000 etc. [47], déterminés par la méthode de dilution, ne sont que des nombres quelconques, plutôt hypothétiques. Ils sont toujours grandement exagérés. Par la méthode des plaques émaillées, on s'assure, comme on

l'a vu, que les densités pour un sol arable fertile ne dépassent que rarement quelques milliers de germes, ou de groupe de germes par gramme.

Le seul milieu étudié par nous, où la densité des nitrificateurs atteint des chiffres formidables, c'est les *boues activées*, dont

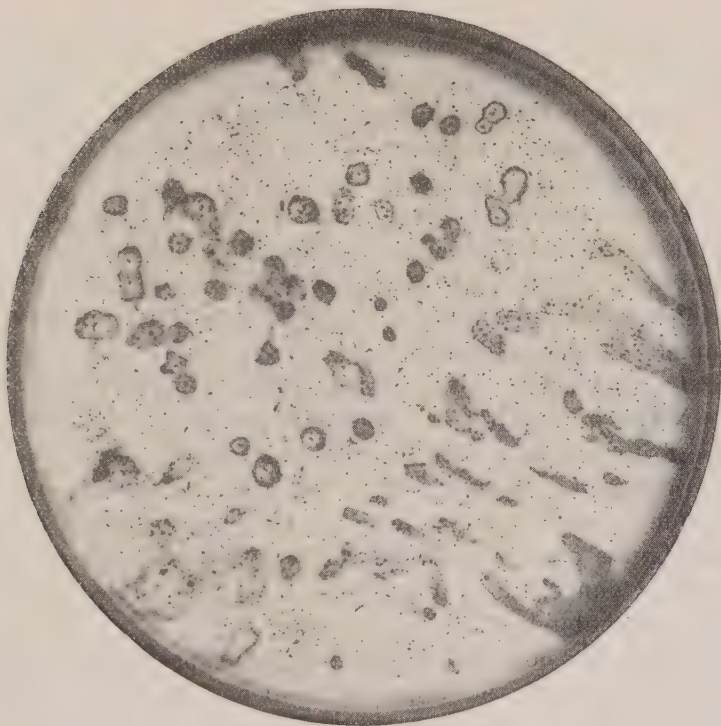


FIG. 11. — Grande plaqueensemencée avec terre *Esp.*
Environ moitié de grandeur naturelle.

un échantillon nous est parvenu grâce à l'obligeance de M. Cambier, directeur du Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris. Nous reviendrons aux microbes nitrificateurs de ce milieu dans un travail ultérieur. Mais nous tenons à terminer ce travail par l'exemple d'une densité imposante que donnent ces boues. Mesuré par la méthode décrite, l'échantillon, tel qu'il est sorti de la station de Colombes, contenait d'après les premières épreuves, des milliards de germes de nitrification par

centimètre cube. Ce chiffre que l'on chercherait vainement dans les sols, paraît suffire pour expliquer l'intensité du phénomène de nitrification que l'on y constate.

Résumé.

1° Quarante ans de recherches ont confirmé tous les caractères physiologiques attribués aux microbes de la nitrification par nos anciens travaux : ce sont des autotrophes, dont l'énergétique est basée exclusivement sur l'oxydation de l'azote ammoniacal et de l'azote nitreux.

2° Les deux groupes sont sensibles à l'influence des aliments organiques non dégradés par l'action microbienne, qui paralysent leur activité. Cette sensibilité est la cause du fait que la nitrification ne se déclenche qu'après la minéralisation presque complète de ces matières.

3° La pullulation des nitrobactéries est paralysée par les ions NH_3 à de très faibles concentrations, ce qui retarde leur activité jusqu'à ce que l'azote ammoniacal soit passé presque intégralement à l'état de l'azote nitreux. C'est là la cause du fait, que la nitrification a lieu en deux phases dans un milieu neuf; tandis que dans un milieu comme le sol qui est déjà peuplé et dont le taux d'ammoniac est très faible, les deux phases se confondent.

4° Toutes les données qui attribuent la capacité de nitrification à des microbes hétérotrophes sont basées sur des défauts de technique, ou des défauts d'interprétation.

5° Les recherches de la longue période écoulée n'ont apporté aucune nouvelle méthode susceptible de remplacer l'ancienne. L'étude de la nitrification dans des milieux naturels a été particulièrement retardée par le manque d'un procédé facile à manier.

6° Une nouvelle méthode est décrite en détail, basée sur l'emploi de plaques de silico-gel, émaillées de bases carbonatées et de kaolin.

7° La méthode permet de différencier et d'isoler les souches avec sûreté. On s'assure que les différents échantillons de sol d'une même région hébergent non seulement des formes libres du

genre *Nitrosomonas*, mais encore des formes appartenant à deux autres genres, dont *Nitrosocystis*, à végétation zooglétique ou kystique, et *Nitrospira*, de nature spirochétique.

8° Les espèces et les souches en sont probablement nombreuses. On en a isolé et décrit dans ce mémoire 5 souches de *Nitrosomonas*, 2 de *Nitrosocystis* et 2 de *Nitrospira*.

9° Au point de vue physiologique, ces formes se distinguent : 1° par l'énergie de leur action, les Nitrosomonades venant en tête, suivies de *Nitrosocystis*, tandis que les formes spirochétiques leur sont bien inférieures; 2° par leur courbe d'activité en fonction de pH.

10° Les échelons optima du pH pour toutes les souches étudiées sont disposées entre pH 6,0 et 9,2. Au-dessous de 6,0, l'activité tombe, dans la majorité des cas, à 0. Trois souches de Nitrosomonades désignées *a*, *b*, *c* se sont montrées pourtant capables de tolérer un pH de 6,0, ou un peu au-dessous, en manifestant une activité très réduite.

11° Les souches des Nitrosobactéries sont très inégalement réparties dans les milieux naturels. Les facteurs de cette répartition sont à chercher : 1° dans la voracité (énergie d'action) de la souche; 2° sa prédilection pour un pH déterminé; 3° sa résistance aux conditions extérieures défavorables. Les Nitrosomonades dominent, ou sont exclusivement représentées, dans les terreaux, les terres fertiles, les eaux résiduaires, etc. Les *Nitrosocystis* seuls ont été trouvés dans les sols forestiers, à l'exclusion des monades. Enfin, les Nitrospires paraissent dominer dans les sols pauvres, incultes.

12° Une méthode est décrite pour déterminer le pouvoir nitrificateur des milieux naturels, basée sur les chiffres de densité des microbes de la nitrification.

Les auteurs sont très obligés à M. P. Jeantet, microphotographe de l'Institut Pasteur, pour les soins qu'il a mis dans l'exécution des clichés photographiques qui illustrent ce mémoire.

Des remerciements sont dus au professeur L. G. Romell pour avoir mis sa collection de clichés à la disposition des auteurs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WINOGRADSKY, Recherches sur les organismes de la Nitrification, 1^{er} Mémoire, *Ces Annales*, 4, 1890, p. 213; 2^e Mémoire, *Ibid.*, 4, 1890, p. 257; 3^e Mémoire, *Ibid.*, 4, 1890, p. 760; 4^e Mémoire, *Ibid.*, 5, 1891, p. 32; 5^e Mémoire, *Ibid.*, 5, 1891, p. 577.
- WINOGRADSKY, Contribution à la morphologie des organismes de la Nitrification. *Arch. des Sc. Biol.*, 1, 1892, p. 88-137.
- WINOGRADSKY, Zur Mikrobiologie des Nitrifikationsprozesses. *Zentr. f. Bakt.*, II, 2, 1896.
- WINOGRADSKY et OMELIANSKY, L'influence des substances organiques sur le travail des microbes nitrificateurs, *Arch. des Sc. Biol.*, 7, 1899, p. 1-39; Même sujet en allemand. *Zentr. f. Bakt.*, II, 6, 1899, p. 329.
- OMELIANSKY, Sur la nitrification de l'azote organique. *Arch. des Sc. Biol.*, 7, 1899; Même sujet en allemand. *Zentr. f. Bakt.*, II, 5, 1899.
- OMELIANSKY, Sur la culture des microbes nitrificateurs du sol. *Arch. des Sc. Biol.*, 7, 1899; Même sujet en allemand. *Zentr. f. Bakt.*, II, 5, 1899.
- WINOGRADSKY, Die Nitrifikation. *Handbuch der Technischen Mykologie herausgegeben von Lafar*, III, 1904, p. 132-181.
- [2] BOULANGER et MASSOL, Etudes sur les microbes nitrifiants. Deux mémoires : I, *Ces Annales*, 17, 1903, p. 492; II, *Ibid.*, 18, 1904, p. 181.
- [3] WIMMER, Beitrag z. Kenntniss der Nitrifikationsbakterien. *Z. f. Hygiene*, 48, 1904, p. 135.
- [4] SCHULZ-SCHULZENSTEIN, Über nitrifizierende Organismen in den Filtern biologischer Kläranlagen. *Hygienische Rundschau*, 12, p. 192, et *Mitth. a. d. Königl. Prüfungsamt. f. Abwässerbeseitigung*, 1903.
- [5] HARRIETTE CHICK, A Study of Nitrification with Reference to the Purification of Sewage. *Proc. R. S.*, 77, séries B, 1906, p. 241-266.
- [7] MEYERHOFF, OTTO, Untersuchungen über den Athmungsvorgang nitrifizierender Bakterien; I. *Pflügers Arch. Ges. Phys.*, 164, 1916, p. 353-427; II. *Ibidem*, 1916, p. 229-284; III. *Ibidem* 166, 1917, p. 240-280.
- [8] GIBBS, The Isolation and Study of Nitrifying Bacteria, *Soil Science*, 8, 1919, p. 427-481.
- [9] AUGUSTO BONAZZI, On Nitrification. II. Intensive Nitrite formations in Solution. *Journ. of Bact.*, 4, 1919, p. 43-60; III. The isolation and Description of the Nitrite Ferment, *Bolan. Gaz.*, 68, 1919, p. 194-206; IV. The Carbon and Nitrogen Relations of the Nitrite Ferment. *Journ. of Bact.*, 6, 1921, p. 479-499; V. The Mechanism of Ammonia Oxidation. *Journ. of Bact.*, 8, 1923, p. 343-363.
- [10] FROE et DAVENPORT, The Effect of Organic Nitrogenous Compounds on the Nitrate-forming Organisms, *Soil Science*, 14, 1921, p. 289-407.
- [11] HEUBÜLT, Untersuchungen über Nitritbakterien. *Planta Arch. f. Wiss. Bot.*, 8, 3, 1929, p. 398-422.
- [12] HORST ENGEL, Die Kohlenstoffassimilation des Nitritbildners. *Ibid.*, p. 423-426.
- [13] ROUBENTCHIK, Zur Nitrifikation bei hohen Salkonzentraktionen. *Zentr. f. Bakt.*, II, 77, 1929, p. 1-18.
- [14] NELSON, Isolation and Characterization of Nitrosomonas and Nitrobacter. *Zentr. f. Bakt.*, II, 83, 1931, p. 280-311.

- [15] STUTZER, Die Organismen der Nitrifikation. *Zentr. f. Bakt.*, 7, p. 168.
- [16] FREMLIN, On the Cultivation of the Nitrosobacterium, *Journ. of Hyg.*, 3, 1903; Further Observations on Nitroso-bacteria. *Journ. of Hyg.*, 14, 1914.
- [17] SACK, Nitratbildende Bakterien. *Zentr. f. Bakt.*, II, 62, 1924, p. 77.
- [18] BEJERINCK, Über das Nitratferment und über physiologische Artbildung. *Folia Microbiologica*, 3, 1914.
- [19] WINOGRADSKY, Sur la prétendue transformation du microbe nitrique en espèce saprophyte. *C. R. Ac. Sc.*, 175, 1922, p. 301.
- [20] RUNOW, Sur la possibilité de la production d'acide nitreux aux dépens des substances organiques et de l'ammoniaque en dehors de l'action de la Nitrosomonade. *Ann. Stat. Bacter. Agron.* (en russe), 24, 1926, p. 189-201.
- [21] RUNOW, Die Nitritbildung in organischen Medien auf biologischem Wege. *Zentr. f. Bakt.*, 77, 1929, p. 193-205.
- [22] MICHOUSTINE, Sur la formation des nitrites par les bactéries. *Ann. Stat. Bact. Agron.* (en russe), 24, p. 200-212.
- [23] GOUBINE, Sur la réaction nitreuse du vibron cholérique. *Ann. Stat. Bacter. Agron.*, 24, 213-217.
- [24] HERAEUS, *Zeit. f. Hyg.*, 1, 1886, p. 193.
- [25] NELSON, The Isolation of some Nitrifying Organisms. *Iowa State Coll. Journ.*, of Sc. III, 2, 1929, p. 113-175.
- [26] CUTLER et MUKERJI, Nitrite Formation by Soil Bacteria, other than Nitrosomonas. *Proc. R. S.*, 108, 1931, p. 334-394.
- [27] LÖHNIS, Über Nitrifikation und Denitrifikation in der Ackererde. *Zentr. f. Bakt.*, II, 13, 1904, p. 706.
- [28] LESLIE COLEMAN, Untersuchungen über Nitrifikation. *Zentr. f. Bakt.*, II, 20, 1908, p. 401.
- [29] STEVENS et WITHERS, The Inhibition of Nitrifikation by Organic Matter, compared in Soils and in Solutions. *Zentr. f. Bakt.*, II, 27, 1910, p. 168.
- [30] KARPINSKI et NIKLEWSKI, Über d. Einfluss organ. Verbindungen auf den Verlauf d. Nitrifikation in unreinen Kulturen. *Zentr. f. Bakt.*, Referat, 20, 1908, p. 618.
- [31] NIKLEWSKI BR., Über die Bedingungen der Nitrifikation in Stallmist. *Zentr. f. Bakt.*, 26, 1910, p. 388.
- [32] KRUSE, Article Nitrifikation dans *Handbuch für allgemeine Mikrobiologie*.
- [33] KASERER, Über einige neue Stickstoffbakterien mit autotropher Lebensweise. *Z. f. land. Versuchswesen in Oesterreich*, 1907, p. 37; Referat *Zentr. f. Bakt.*, 20, 1908, p. 170.
- [34] RITTER, Beitr. z. Kenntniss der Bakterien von. Hoch-und Niedermoor-sen. *Zentr. f. Bakt.*, 34, 1912, p. 577.
- [35] HALL, MILLER et GIMINGHAM. *Proc. R. S.*, 80, 1908, p. 196-212.
- [36] BARTHEL, Beitrag z. Frage der Nitrifikation in der Ackererde. *Zentr. f. Bakt.*, 49, 1920, p. 382.
- [37] WEIS, Undersogelser over jordbundens reaktion og nitrifikationsevne i typiske danske bogeskov. Meddelelser fra dansk skovforenings godningsforsog. IV. København 1924.
- [38] ARND, Zur Kenntnis der Nitrifikation in Moorböden. *Zentr. f. Bakt.*, 49, 1919, p. 1.
- [39] GAARDER et HAGEM, Salpetersyredannelse i udyrket jord. I. Orienteren de Analyser. *Meddelelse*, n° 4, Bergen, 1921, 172 p. II. Nitrifikationens Avhaengighet av Vandstoffkoncentrationen. *Meddelelse*, n° 11, 1928, Bergen, 194 p.

- [40] WAKSMAN, Microbiological Analysis of Soil as an Index of Fertility. IV. Nitrifikation. *Soil Sc.*, 1923, p. 55.
- [41] J. ZIEMIECKA, La nitrification et la fertilité du sol. *Studia nad mikrobiologia, gleby*, 4, 1930.
- [42] HESSELMAN. Studier över Barrskogens Humustacke. Stockholm, 1926.
- [43] WINOGRADSKY, Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification. *C. R. Ac. Sc.* 192, p. 1000, 1931; *C. R. Ac. Agric.*, 17, 1931.
- [44] ROMELL, En Nitritbakterie ur Svensk Skogsmark. (Un ferment nitreux forestier), Résumé français. *Meddelanden fran Statens Skog, örsöksanstalt*, Häfte 24, n° 1, 3, 1928, 57-6.
- [45] ROMELL, A Nitrosocystis from American Forest Soil. *Svensk Bot. Tidskrift.*, 26, 1932, p. 303-312, 4 planches.
- [46] HIDEYO NOGUSHI, The Spirochetes. Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology. Edited by E. O. Jordan et I. S. Falk. Chap. XXXVI.
- [47] FEHER. Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Mikroben-tätigkeit im Waldboden. *Arch. f. Mikrobiologie*, 4, 1930, p. 464.
- [48] G. ROSSI et G. GESUÈ, Di un nuovo indizizzo nello studio biologico dal suolo. *Annali di Tecnica Agraria*, III, fasc. II, 1930.
- [49] CHOLODNY. Ueber eine neue Methode z. Untersuchung d. Bodenmikroflora. *Archiv f. Mikrobiologie*, 1, p. 621, 1930.

EXPLICATION DES PLANCHES

Clichés de M. Jeantet, microphotographe de l'Institut Pasteur, excepté les photogrammes n°s 8, 10 et 11 empruntés, avec la permission de l'auteur, au travail de M. Romell, cité dans la liste bibliographique sous le n° 44.

PLANCHE V.

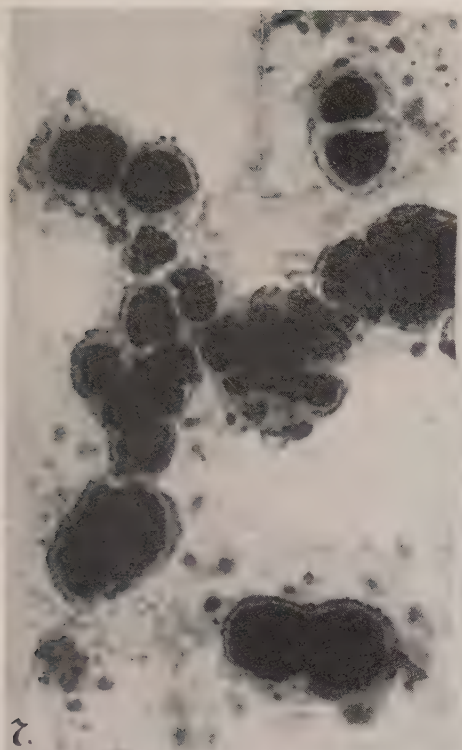
- N° 1. *Nitrosomonas*, souche *a* : 1.800 x.
 N° 2. *Nitrosomonas*, souche *b* : 1.800 x.
 N° 3. *Nitrosomonas*, souche *c* : 1.800 x.
 N° 4. *Nitrosomonas*, souche *d* : 1.800 x.
 N° 5. *Nitrosomonas*, souche *e* : 1.800 x.
 N° 6. *Nitrobacter* : 1.800 x.
 N° 7. *Nitrosocystis*, souche *a*, kystes : 1.800 x.
 N° 8. *Nitrosocystis* forestier (Romell) : 1.000 x.
 N° 9. *Nitrosocystis*, souche *a*, dispersion : 1.800 x.
 N° 10. *Nitrosocystis* forestier (Romell) : 1.000 x.
 N° 11. *Nitrosocystis* forestier, sclerotiums (Romell) : 1.000 x.

PLANCHE VI.

- N° 12. *Nitrosospira*, souche de Brie : 1.800.
 N° 13. *Nitrosospira*, souche antarctique : 1.800 x.
 N° 14. *Nitrosospira*, souche de Brie : 1.800 x.
 N° 15. *Nitrosospira*, souche de Brie : 1.800 x.
 N° 16. *Nitrosospira*, état zoogléique ou kystique : 1.800 x.
 N° 17. *Nitrosospira*, pseudo-coccus : 1.800 x.
 N° 18. *Nitrosospira*, souche de Brie : 3.600 x.
 N° 19. *Microderma minutissima*, groupées en chapelets et guirlandes : 1.800 x.
 N° 20. *Microderma vacuolata* : 1.800 x.
 N° 21. *Bactoderma alba* : 1.800 x.
 N° 22. *Bactoderma rosea* : 1.300 x.

Le Gérant : G. MASSON.

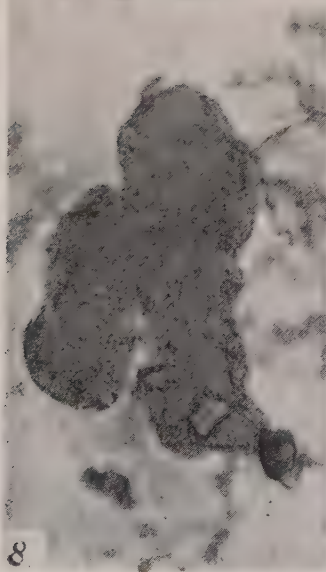




7.



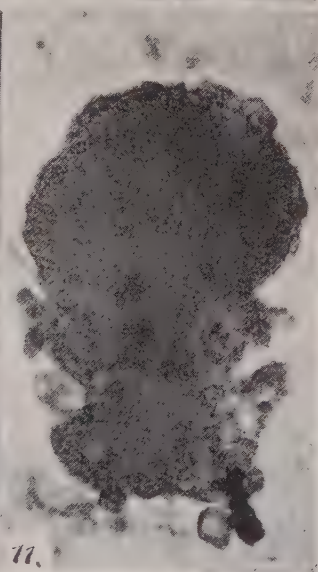
9.



8



10.



11.

